

Aus der Medizinischen Klinik
Klinikum Starnberg
Akademisches Lehrkrankenhaus der Ludwig-Maximilians-Universität München
Chefarzt: Prof. Dr. Peter Trenkwalder
und

Aus dem
Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. Ulrich Pohl

**Die endotheliale Tyrosinphosphatase SHP-1 spielt eine wichtige Rolle für die
vaskuläre Hämostase in TNF α -induzierter Inflammation *in vivo***

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Elisabeth Pircher, geb. Koch
aus
München
2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. Florian Krötz
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Christian Schulz PD Dr. Christoph Bidlingmaier
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung:	28.02.2019

Inhalt

1	EINLEITUNG	6
1.1	Kardiovaskuläre Erkrankungen	6
1.2	Das Endothel	6
1.2.1	Oxidativer Stress und endotheliale Dysfunktion	6
1.3	Das inflammatorische Zytokin TNF α in kardiovaskulären Erkrankungen	7
1.4	Die Rolle von Thrombozyten bei Thrombose und endothelialer Inflammation	8
1.5	Die Tyrosinphosphatase SHP-1	11
1.5.1	Aufbau und Regulation	11
1.5.2	Klinische Bedeutung der SHP-1	14
1.5.3	SHP-1 und Inflammation	15
2	FRAGESTELLUNG	16
3	MATERIAL UND METHODEN	17
3.1	<i>In vivo</i> Versuche	17
3.1.1	Versuchstiere	17
3.1.2	Anästhesie und Applikation pharmakologischer Substanzen	17
3.1.3	Implantation der Rückenhautkammer	18
3.1.4	Implantation des arteriellen Verweilkatheters	20
3.1.5	Intravitalmikroskopie	20
3.1.6	Isolierung und Färbung von Mausthrombozyten	21
3.1.7	Analyse der Thrombozyten-Endothel-Interaktion	21
3.1.8	Analyse der arteriolären Thrombose	24
3.2	<i>In vitro</i> und <i>ex vivo</i> Versuche	26
3.2.1	Kultivierung von primären Endothelzellen	26
3.2.2	Proteinnachweis mit Gel-Elektrophorese und <i>Western blot</i>	27
3.2.3	Durchflusszytometrie	30
3.2.4	Messung der SHP-1-Phosphatase-Aktivität	30
3.2.5	Thrombozytenaggregometrie	32
3.3	Graphische Darstellung und statistische Analyse	37

4	ERGEBNISSE	38
4.1	<i>In vivo</i> Applikation von TNF α und Natrium Stibogluconate	38
4.2	Thrombozyten-Endothel-Interaktion <i>in vivo</i>	38
4.3	Arteriöläre Thrombose <i>in vivo</i>	41
4.4	SHP-1 Hemmung in Endothelzellen <i>in vitro</i>	43
4.5	Oberflächenexpression endothelialer Adhäsionsmoleküle	44
4.6	Einfluss der SHP-1 Hemmung auf die Thrombozytenaggregation	46
4.6.1	Thrombozytenaggregation in humanem <i>Platelet rich plasma</i> (PRP)	46
4.6.2	Thrombozytenaggregation im Vollblut der Maus	48
4.7	Einfluss von TNF α auf SHP-1-Aktivität und -Expression	50
4.7.1	SHP-1-Phosphatase-Aktivität	50
4.7.2	SHP-1-Proteinexpression	52
5	DISKUSSION	53
5.1	Inflammation und atherothrombotische Ereignisse	53
5.2	Methodische Aspekte und Limitationen	54
5.2.1	Das Modell der Rückenhautkammer in der Maus	54
5.2.2	Analyse der Thrombozyten-Endothel-Interaktion <i>in vivo</i>	55
5.2.3	Gefäßverletzung durch Fe ₃ Cl ₂ als Thrombosemodell in der Maus	56
5.2.4	Methoden zur Messung der Thrombozytenaggregation	57
5.2.5	Natrium Stibogluconate als spezifischer Inhibitor der SHP-1	58
5.3	Rolle der SHP-1 in TNF α -induzierter Entzündung	59
5.3.1	Hemmung der SHP-1 bewirkt prothrombotische Effekte <i>in vivo</i>	59
5.3.2	Welche Rolle spielen dabei direkte Effekte auf Thrombozyten?	60
5.4	Rolle der SHP-1 im TNF α -Signalweg	62
5.5	Klinische Relevanz	63
6	ZUSAMMENFASSUNG	65
7	APPENDIX	68
7.1	Tabellenverzeichnis	68
7.2	Verwendete Substanzen und Chemikalien	78
7.3	Abkürzungsverzeichnis	83

7.4 Literatur	86
7.5 Veröffentlichungen	97
7.6 Danksagung	98

1 EINLEITUNG

1.1 Kardiovaskuläre Erkrankungen

Seit Langem führen die Herz-Kreislauf-Erkrankungen die Liste der häufigsten Todesursachen des Statistischen Bundesamtes an (1). Im Jahr 2015 verstarben in Deutschland etwa 350.000 Menschen an dieser Gruppe von Erkrankungen, zu der insbesondere Folgeerscheinungen der Atherosklerose wie ischämischer Myokardinfarkt gehören (2). 1990 lag diese Zahl noch bei etwa 460.000. Effiziente Aufklärungsarbeit hat viel zu einer verbesserten Prävention beigetragen, aber auch in der Behandlung manifester Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems wurden, nicht zuletzt wegen verbesserter interventioneller und pharmakologischer Optionen, enorme Fortschritte erzielt (3). Die Höhe der absoluten Zahlen an betroffenen Patienten zeigt jedoch, wie dringlich die Forschung in der kardiovaskulären Medizin nach wie vor ist (4).

1.2 Das Endothel

Das Endothel ist die innerste, einzellige Schicht der Wand der Blutgefäße. Die Endothelzellen bilden eine direkte Kontaktfläche mit den Blutzellen und eine mechanische Barriere gegen das Eintreten mikrobieller Erreger. Sie haben viele wichtige Funktionen; dazu gehören Regulierung des Stoffaustausches, Beeinflussung des Blutdruckes über Produktion vasoaktiver Substanzen, Angiogenese und Hämostase (5). Durch ein intaktes Endothel wird ein Gleichgewicht zwischen der Aktivierung der plasmatischen Gerinnung und der Fibrinolyse aufrechterhalten (6). Zudem setzt das Endothel kontinuierlich Substanzen wie Stickstoffmonoxid (NO) und Prostazyklin frei, die eine Adhäsion der Thrombozyten unterbinden (7). Eine engmaschige Regulation der Endothelfunktion ist für dieses hämostasiologische Gleichgewicht essentiell (8).

1.2.1 Oxidativer Stress und endotheliale Dysfunktion

Reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) sind Moleküle, die Sauerstoff enthalten, und wegen ihrer unpaaren Elektronen hochreaktiv sind. Wichtige Vertreter der ROS sind etwa H_2O_2 und O_2^- . ROS sind nicht nur ein Produkt des normalen O_2 -Metabolismus, sondern spielen als *second messenger* auch eine wichtige Rolle in zellulären Signalwegen (9, 10). Wichtige Quellen der endothelialen ROS sind die NADPH-Oxidasen (*non-phagocytic nicotinamide adenine*

dinucleotide phosphate oxidases), oder auch mitochondriale Enzyme, die Xanthinoxidase, Cyclooxygenase und NO-Synthase (11).

Die Situation, in der ein Ungleichgewicht zwischen Antioxidantien und ROS vorliegt, wird als Oxidativer Stress bezeichnet. Er führt zu einem chronischen Entzündungsprozess mit Veränderungen an der Gefäßwand und mündet in der sogenannten endothelialen Dysfunktion, einer Störung des Endothels, welches seine Funktionen nicht mehr suffizient aufrechterhalten kann. Protektive Mechanismen versagen, wodurch sich Schäden an der Gefäßwand manifestieren können, welche die Entstehung atherosklerotischer Veränderungen begünstigen. Konkret wird die vasorelaxierende und thrombozytenhemmende Wirkung von NO aufgehoben, indem es durch ROS inaktiviert wird (9, 12-14). Oxidativer Stress kann unter anderem durch Faktoren wie Hypoxie, Nikotinabusus, Hyperglykämie, Luftverschmutzung und Alkohol ausgelöst werden (15).

1.3 Das inflammatorische Zytokin TNF α in kardiovaskulären Erkrankungen

1975 wurde erstmals über einen Faktor berichtet, der Endotoxin-vermittelt produziert wird und zur Lyse und Nekrose von Tumorzelllinien führt (16). Dieses 26 kDa schwere Protein, das vor allem in Makrophagen und T-Zellen produziert wird, wird heute als Tumornekrosefaktor α (TNF α) bezeichnet (17). TNF α vermittelt seine vielfältigen Effekte über zwei transmembranöse Rezeptoren, den TNF-Rezeptor 1 (TNFR1) und TNF-Rezeptor 2 (TNFR2) (17, 18). Der TNFR1, der ubiquitär exprimiert wird, besitzt in seinem intrazellulären Abschnitt eine sog. *death domain* Sequenz. Diese kann eine Kaskade in Gang setzen, die in Apoptose mündet. Dabei spielt die Translokation des Transkriptionsfaktors NF- κ B in den Nukleus eine wichtige Rolle. Der TNFR1 scheint die klassischen, proinflammatorischen Effekte von TNF α zu vermitteln. Abhängig vom Mikromilieu können über TNFR1-Signalwege jedoch auch die Zellproliferation-, migration-, und differenzierung im Sinne des Zellüberlebens angeregt werden (19-23). Der TNFR2 wird vor allem auf Immun- und Endothelzellen sowie Astrozyten exprimiert, und besitzt keine *death domain* (19, 24). Er nimmt eine Rolle in der Differenzierung von T-Lymphozyten ein, induziert in Endothelzellen Angiogenese und moduliert verschiedene Adhäsionsmoleküle (19, 23). Insgesamt ist über seine komplexen Funktionen immer noch weitaus weniger bekannt als über die des TNFR1.

TNF α nimmt eine Schlüsselrolle in zahlreichen inflammatorischen Prozessen, in der Immunabwehr von Infektionen sowie in Autoimmunerkrankungen wie Psoriasis, Morbus Crohn und Rheumatoide

Arthritis ein (17, 25, 26). In ihrer klinischen Behandlung sind die anti-TNF α -Antikörper Infliximab und Adalimumab oder auch Etanercept (löslicher TNF-Rezeptor) bereits wichtige Bestandteile (27, 28). Die klassischen klinischen Entzündungszeichen *rubor*, *calor* und *tumor* werden durch TNF α -induzierte Cyclooxygenase-2-Wirkung vermittelt.

Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass inflammatorische Prozesse auch einen entscheidenden Faktor in der Pathophysiologie der kardiovaskulären Erkrankungen darstellen (29). Sie spielen eine Rolle bei den ersten Schritten der Gefäßwandveränderungen über die Entwicklung der Plaques bis hin zur Ruptur und den nachfolgenden Komplikationen (30, 31). In diesem Zusammenhang überrascht es nicht, dass gesteigerte TNF α -Plasmaspiegel mit einem erhöhten Risiko für das Auftreten atherothrombotischer Ereignisse wie Myokardinfarkt oder Schlaganfall korrelieren (32-34). Eine Studie mit Patienten, die bereits einen Myokardinfarkt erlitten hatten, zeigte, dass die TNF α -Plasmakonzentrationen bei denjenigen Patienten, die ein erhöhtes Rezidivrisiko für koronare Ereignisse haben, noch Monate nach dem Erstereignis erhöht sind (35).

Im Rahmen der durch TNF α induzierten inflammatorischen Veränderungen kommt es zu einer Aktivierung von Endothelzellen. Diese reagieren mit einer Freisetzung von Chemokinen wie IL-8, IL-10 und MCP-1 und der Hochregulation verschiedener Adhäsionsmoleküle wie VCAM-1 und ICAM-1, was zur Zunahme atherosklerotischer Plaques führen kann (36, 37). Durch Translokation von NF- κ B in den Zellkern werden vermehrt ROS synthetisiert. Über diese und andere Mechanismen, wie vermehrte Expression von *tissue factor* (TF) an der Zelloberfläche und folgender Aktivierung der Gerinnungskaskade, kann TNF α prothrombotische Veränderungen am Endothel bewirken (23, 38-41).

1.4 Die Rolle von Thrombozyten bei Thrombose und endothelialer Inflammation

Die wichtigste Aufgabe der Thrombozyten ist ihre Rolle in der Hämostase. Thrombozyten sind wegen ihrer maßgeblichen Beteiligung an der Blutstillung lebenswichtig. Nach einer Gefäß- und Endothelverletzung erhalten Thrombozyten Kontakt mit subendotheliale Collagen, welches an thrombozytäre Oberflächenrezeptoren, insbesondere den Glykoprotein VI-Rezeptor bindet (42, 43). Dadurch werden die Thrombozyten aktiviert und ändern ihre flache Form hin zu einer stacheligen und plumperen Form, was die Anheftung weiterer Thrombozyten erleichtert (44, 45). Nach Aktivierung intrazellulärer Signalwege erfolgt eine Überführung des oberflächenständigen Integrins Glykoprotein IIb/IIIa (GPIIb/IIIa) von seiner inaktiven in eine aktivierte Konformation,

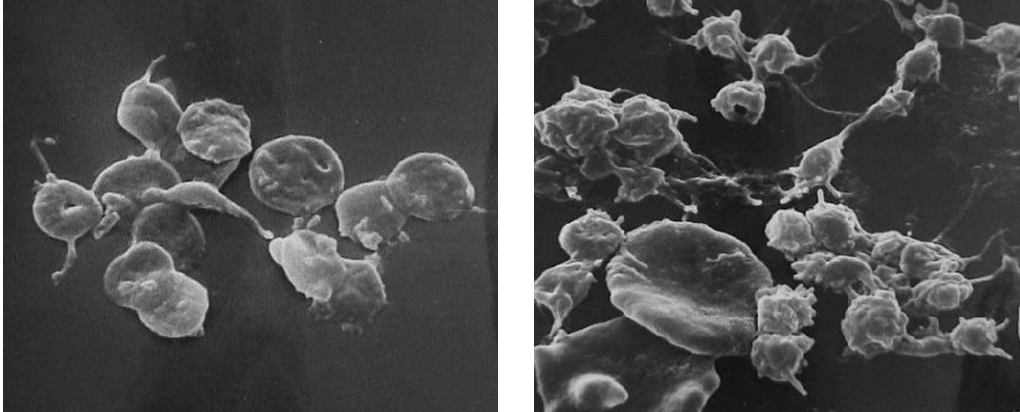
EINLEITUNG

woran Fibrinogen binden und eine Quervernetzung der Thrombozyten erfolgen kann (46, 47). Zudem setzen die Thrombozyten aus intrazellulären Granula Mediatoren wie Adenosindiphosphat (ADP) und Thromboxan frei, welche über auto- und parakrine Mechanismen die Aggregation verstärken (48). Zeitgleich wird durch Aktivierung der Gerinnungskaskade Prothrombin zu Thrombin gespalten. Thrombin aktiviert direkt Thrombozyten, und spaltet Fibrinogen zu Fibrin, wodurch eine feste Aggregation der Thrombozyten mit Bildung eines stabilen Thrombus ermöglicht wird (49, 50). In bestimmten Situationen wie bei akutem Myokardinfarkt oder ischämischem Schlaganfall, bei denen es im Rahmen der Ruptur eines atherosklerotischen Plaques zu einer Endothelverletzung kommt, können diese Prozesse lebensgefährliche Gefäßverschlüsse verursachen.

Seit einiger Zeit ist bekannt, dass Thrombozyten nicht nur im Rahmen einer akuten Plaqueruptur, sondern bereits zu einem frühen Zeitpunkt in der Pathogenese der Atherosklerose eine entscheidende Rolle spielen (51-55). Hierbei können Thrombozyten-Endothel-Interaktionen zugrundeliegende entzündliche Prozesse beeinflussen. Thrombozyten stehen in ständigem Kontakt mit dem Endothel. Unter physiologischen Bedingungen verhindern endotheliale Faktoren wie NO und Prostazyklin die Adhäsion (56). Bei endothelialer Dysfunktion oder entzündlichen Veränderungen versagen diese Mechanismen, und endotheliale Adhäsionsmoleküle wie P-Selectin und von Willebrand-Faktor werden aus den Weibel-Palade-Körperchen an die Zelloberfläche transloziert. Dadurch können Thrombozyten (ähnlich wie Leukozyten) an der Gefäßwand entlang rollen und an ihr anhaften (57). Die endothelialen Adhäsionsmoleküle interagieren dabei insbesondere mit dem thrombozytären Glykoprotein Ib (49, 58). Hierdurch werden Thrombozyten aktiviert und setzen weitere proinflammatorische Zytokine wie Interleukin-1 β (IL-1 β), CD40L und RANTES (CCL5) frei, welche die endotheliale Entzündung weiter verstärken (59, 60).

Thrombozyten spielen somit nicht nur in der Blutstillung oder im Rahmen von thrombotischen Ereignissen eine Rolle, sondern sind auch wichtige Modulatoren von akuten oder chronischen Entzündungsprozessen.

Abbildung 1



Thrombozyten in ruhendem und aktiviertem Zustand. Im Ruhezustand besitzen Thrombozyten eine scheibenartige Form (links). Im Falle einer Aktivierung, z. B. nach Kontakt mit subendothelialen Strukturen nach Schädigung der Gefäßwand, verändern sie ihre Form (*shape change*, rechts), indem sie anschwellen und Pseudopodien ausbilden. Hierdurch wird nicht nur das Anhaften an der defekten Gefäßwand erleichtert, sondern auch die Rekrutierung und Aktivierung weiterer Thrombozyten. Elektronenmikroskopische Aufnahme von ruhenden und aktivierten Thrombozyten aus: Breddin et al. 2005 (61).

1.5 Die Tyrosinphosphatase SHP-1

Proteine bilden den Grundbaustein unserer Zellen. Die Steuerung ihrer unzähligen Funktionen, ihres Konformationszustandes und ihrer katalytische Aktivität ist von essentieller Bedeutung. Dies kann über Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Tyrosinresten durch Kinasen bzw. Phosphatasen geschehen. Mehr als hundert Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTPs) wurden bislang im humanen Genom identifiziert, wobei alle PTPs eine hoch-konservierte katalytische Domäne besitzen. Eine dieser PTPs ist die 68 kDa schwere *Src homology region 2 domain-containing phosphatase-1* (SHP-1), sie wurde 1991 erstmals beschrieben (62).

1.5.1 Aufbau und Regulation

Die SHP-1 (weitere Bezeichnungen SHPTP-1, SHP, HCP, PTPN6 oder PTP1C) ist eine zytosolische Tyrosinphosphatase, die vor allem in hämatopoetischen Zellen exprimiert wird (63, 64). Neben ihrer katalytischen Domäne zur Protein-Tyrosin-Dephosphorylierung und ihrer regulatorischen C-terminalen Domäne besitzt sie noch zwei SH2-Domänen am NH₂-Terminus (65). Ihre intramolekulare Interaktion hemmt unter basalen Bedingungen die katalytische Aktivität der SHP-1, indem die Bindungsstelle der Phosphatase-Domäne (PTPase-Domäne) für potentielle Substrate blockiert wird (66, 67). In diesem Zustand sind die C-terminalen Tyrosinreste pY536 und pY564 dephosphoryliert. Eine Phosphorylierung von Y536 führt zur Demaskierung der PTPase-Domäne, die nun ihrerseits mit potentiellen Substraten interagieren kann (68). Zudem ist für eine maximale Phosphataseaktivität der SHP-1 eine Phosphorylierung von Y564 notwendig (69).

Einen wichtigen Mechanismus bei der Aktivierung der SHP-1 stellen die sog. *immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs* (ITIMs) dar, konservierte Regionen in verschiedenen inhibitorischen Rezeptoren des Immunsystems. Wenn solche Rezeptoren mit einem Liganden interagieren, kann ihre ITIM-Region phosphoryliert werden und nachfolgend die SHP-1 binden und aktivieren (70, 71).

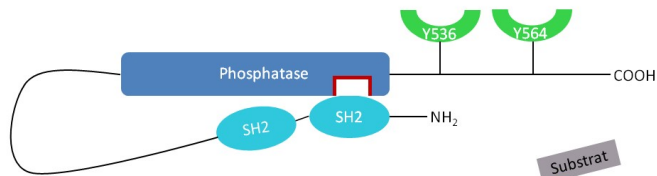
Das SHP-1 codierende Gen ist im humanen Genom auf dem Chromosom 12 (p11-p13) lokalisiert. Diese Region ist oft in chromosomalen Rearrangements bei jungen Patienten mit Akuter Lymphatischer Leukämie (ALL) beteiligt (72). Deswegen wurde der SHP-1 schon früh eine bedeutende Rolle in der Regulation hämatopoetischer Zellen zugeschrieben. Nachfolgende Untersuchungen, unter anderem auch eindrucksvolle Studien in Mäusen mit einem defekten SHP-

EINLEITUNG

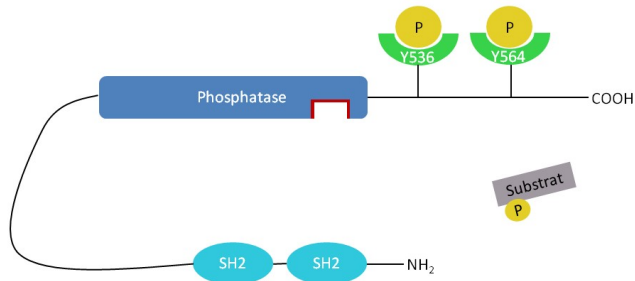
1-Gen (*motheaten* (*me*) Mutation, dt. „mottenzerfressen“, nach den auffälligen Hautläsionen) bestätigten dies (64, 73). Die homozygoten Tiere zeigen schwerste Immundefekte mit beeinträchtigter humoraler und zellvermittelter Immunantwort, sowie extramedullärer Hämatopoese und Splenomegalie (74). Es entsteht eine chronische Entzündungslage mit hämorrhagischer Pneumonitis, die bei Tieren mit vollständigem Fehlen des SHP-1-Proteins (*me/me mice*) innerhalb von etwa 3 Wochen und bei Tieren mit eingeschränkter SHP-1-Funktion (*me^v/me^v mice*, *motheaten viable*) nach etwa 9 Wochen zum Tod führt (73, 75, 76).

Abbildung 2

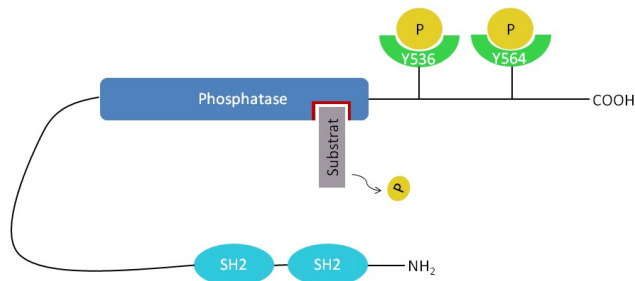
A



B



C



Schematische Darstellung der SHP-1 Domänen während verschiedener Aktivierungszustände. (A) Inaktiver Zustand der SHP-1: die zwei namensgebenden SH2-Domänen blockieren die Phosphatasedomäne mit der Bindungsstelle für mögliche Substrate. (B) Nach Phosphorylierung der Tyrosinreste Y536 und Y564 an der regulatorischen C-terminalen Domäne kommt es zu einer Konformationsänderung, und die Bindungsstelle der Phosphatasedomäne wird freigegeben. (C) Die Phosphatasedomäne kann ein Substrat binden und ihre katalytische Funktion im Sinne einer Dephosphorylierung des Substrats ausüben.

1.5.2 Klinische Bedeutung der SHP-1

In Einklang mit der eben genannten Datenlage ist es nicht überraschend, dass die SHP-1 in Krankheitsbildern, die die Hämatopoese betreffen, beteiligt ist. Patienten mit Myelodysplastischem Syndrom zeigen bei schwacher SHP-1-Expression in myeloischen Vorläuferzellen ein signifikant kürzeres Überleben (77), und in malignen Zellen des kutanen T-Zell-Lymphoms wurde eine reduzierte Expression der SHP-1 gezeigt (78).

Es gibt aber auch Hinweise auf eine Bedeutung der SHP-1 jenseits der direkten Hämatopoese. So konnten in einer Studie in Ratten erhöhte SHP-1-Proteinlevel im akuten Myokardinfarkt nachgewiesen werden, und durch eine Behandlung mit SHP-1 siRNA konnte die Infarktgröße reduziert werden, was durch eine Hemmung der Apoptose in Kardiomyozyten erklärt wird (79). Weitere Studien zeigen, dass die SHP-1 auch in humanen und murinen Thrombozyten exprimiert wird, wobei ihre Funktion in diesen Zellen noch zu großen Teilen ungeklärt ist. Verschiedene Arbeiten beschreiben eine Beteiligung der SHP-1 an der Steuerung der Thrombozytenaktivierung und -aggregation (80, 81).

Ein Krankheitsbild, in dessen Pathogenese die SHP-1 von großer Bedeutung ist, ist die Leishmaniose, eine durch den obligat intrazellulären Parasiten *Leishmania* ausgelöste tropische Infektionskrankheit mit phagozytärer Dysfunktion und in der Folge fehlerhaften Immunabwehr. Es wurde gezeigt, dass in mit *L. donovani* infizierten Zellen die Phosphorylierung und die Aktivität der SHP-1 bereits eine Stunde nach Infektion erhöht sind. Durch die Aktivierung der SHP-1 werden verschiedene Signalwege der hämatopoetischen Zellen so gehemmt, dass passendere Bedingungen für das Überleben der Parasiten entstehen, etwa durch Hemmung der NO-Produktion (82).

Für die Therapie der verschiedenen Leishmanioseformen steht seit etwa siebzig Jahren Natrium Stibogluconate (engl. *Sodium Stibogluconate*, im Folgenden abgekürzt als SS) zur Verfügung. Pathak et al. (83) konnten zeigen, dass Natrium Stibogluconate seine Wirkung über eine Hemmung der SHP-1 ausübt, mit der es einen stabilen Komplex bildet. Die therapeutische Dosis von 10 µg/ml (11 µM) hemmt die SHP-1 Aktivität zu 99 %, gleichzeitig wirkt Sodium Stibogluconate sehr selektiv. Für die Hemmung anderer Phosphatasen wie SHP-2 oder PTP1B werden zehnfach höhere Konzentrationen von Sodium Stibogluconate benötigt.

1.5.3 SHP-1 und Inflammation

Zahlreiche Arbeiten geben Hinweise, dass die SHP-1 einen negativen Regulator bei inflammatorischen Prozessen darstellen könnte. So liegen in den *me^y/me^y*-Mäusen erhöhte Level der immunmodulierenden Zytokine IL-6, IL-10, Interferon γ und auch TNF α vor (84-86). Studien in SHP-1-defizienten Tiere legen außerdem eine entscheidende hemmende Rolle der SHP-1 in allergischer Entzündung nahe (87, 88). In Makrophagen konnte die SHP-1 die Bildung von NO reduzieren und somit potentielle schädliche Effekte von ROS vermindern (89). Vorarbeiten aus der eigenen Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass die SHP-1 auch in Endothelzellen exprimiert wird und hier einen negativen Regulator der NADPH-Oxidase darstellt. Über eine Hemmung der PI3-Kinase-Aktivität und folgender Inaktivierung der GTPase Rac1 werden letztendlich weniger endotheliale ROS gebildet (90).

2 FRAGESTELLUNG

Im Rahmen der vorliegenden Studie sollte geklärt werden, welchen Einfluss die SHP-1 auf Thrombozyten-Endothel-Interaktion und arterielle Thrombose *in vivo* hat. Dies wurde unter nicht-entzündlichen Bedingungen, sowie in TNF- α -induzierter Inflammation untersucht. Hierfür wurden intravitalmikroskopische Experimente im Rückenhautkammermodell für Mikrozirkulation in der Maus durchgeführt. Mechanistische Aspekte wurden *in vitro* an isolierten Endothelzellen sowie Thrombozyten untersucht.

Die konkreten Fragestellungen waren:

- Welche Bedeutung hat die SHP-1 für Thrombozyten-Endothel-Interaktion *in vivo*?
- Hat die SHP-1 einen Einfluss auf arterielle Thrombose *in vivo*?
- Welche Effekte vermittelt die SHP-1 in Endothelzellen *in vitro*?
- Hat die SHP-1 einen Effekt auf die Thrombozytenaggregation *in vitro*?
- Welchen Einfluss hat TNF α auf die endotheliale SHP-1?

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 *In vivo* Versuche

3.1.1 Versuchstiere

Die tierexperimentellen Versuche wurden mit Wildtyp C57BL/6J - Mäusen (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) durchgeführt. Die Tiere wurden im Tierstall des Instituts für Physiologie München, Schillerstr. 44, gehalten und weitergezüchtet. Sie konnten sich innerhalb des Käfigs frei bewegen und hatten ständig Zugang zu Trockenfutter und Wasser. Es bestand ein 12-stündlich wechselnder Hell-Dunkel-Rhythmus. Alle Experimente wurden unter Beachtung des Deutschen Tierschutzgesetzes §1, §2 und §2a und nach Genehmigung der Regierung von Oberbayern (TVA AZ 55.2-1-54-2532-162-08) durchgeführt, und erfüllten die Richtlinie des Europäischen Parlaments (2010/63/EU). Nach Abschluss des Versuchs wurden die Tiere jeweils mit einer Überdosis Pentobarbital eingeschläfert.

3.1.2 Anästhesie und Applikation pharmakologischer Substanzen

Die Präparation der Rückenhautkammer, die Implantation eines arteriellen Verweilkatheters und sämtliche Blutentnahmen der Maus erfolgten unter einer standardisierten 3-fach Narkose mit Midazolam, Medetomidin und Fentanyl (siehe Tabelle A1). Die Anästhetika wurden in physiologischer Kochsalzlösung (NaCl) verdünnt und mit einer 26 Gauge-Nadel intraperitoneal appliziert. Das Gewicht der Tiere wurde zuvor auf einer Kleintierwaage bestimmt. Die Mäuse hatten zum Versuchszeitpunkt ein Körpergewicht zwischen 20 - 30 Gramm. Die suffiziente Narkosetiefe wurde mittels Kontrolle des Zwischenzehenreflexes engmaschig überwacht. Gegebenenfalls wurde eine Nachdosierung (10 % der Ausgangsdosis) vorgenommen. Die Augen wurden mit Bepanthen-Salbe bedeckt, damit die Hornhaut vor Austrocknung geschützt war. Um Auskühlung zu verhindern, wurden die Tiere während sämtlicher chirurgischer Maßnahmen auf einer Wärmeplatte positioniert. Die postoperative Analgesie wurde durch zweimal tägliche Gabe von Buprenorphin 0,065 mg/kg KG subkutan gewährleistet. Alle Tiere wurden ab Versuchsbeginn täglich in Augenschein genommen und anhand der *score sheet* Kriterien untersucht.

Die Applikation von pharmakologisch wirksamen Substanzen für die *in vivo* Versuche erfolgte über einen arteriellen Verweilkatheter (siehe Kapitel 3.1.4). Die Dosierung der Substanzen erfolgte bei

bekannter angestrebter Endkonzentration im Serum nach einer Formel, nach der anhand des Körpergewichts für jedes Tier die individuelle zu verabreichende Gesamtdosis berechnet wurde. Dabei wurde ein durchschnittliches Blutvolumen der Maus von 74 ml/kg KG zu Grunde gelegt (91). Nach Applikation der pharmakologisch wirksamen Substanz wurde das im Katheter befindliche Volumen mit NaCl nachgespült und der Katheter anschließend wieder verschlossen.

3.1.3 Implantation der Rückenhautkammer

Das Modell der transparenten Rückenhautkammer ist ein anerkanntes Modell zur Untersuchung der Mikrozirkulation *in vivo*. Dabei werden Gefäße in der Rückenhaut der Maus freipräpariert und die sehr dehnbare Haut zwischen zwei dünnen Platten aus Titan fixiert (Spezialanfertigung, Werkstatt des Instituts für Chirurgische Forschung, LMU München, Deutschland). Vor und nach jedem Eingriff wurden die chirurgischen Instrumente und die Kammer gesäubert und autoklaviert. Für den chirurgischen Eingriff wurden die Tiere wie in Kapitel 3.1.2 beschrieben narkotisiert. Nach Testung des Zwischenzehenreflexes wurden die Tiere am Rücken rasiert (Haarschneider, Aesculap, Tuttlingen, Deutschland) und die verbliebenen Haare mit Enthaarungscreme (Pilcamed, Schwarzkopf, Düsseldorf, Deutschland) entfernt. Nach feuchter Reinigung wurde die enthaarte Haut mit 70-prozentigem Alkohol desinfiziert. Die Rückenhaut der Maus wurde mit Fäden gestrafft und unter Spannung gehalten. Nun konnte die hintere Titanplatte positioniert und mit zwei Nähten an der Rückenhaut befestigt werden. Die korrekte Lage in Bezug auf die subkutan verlaufenden Blutgefäße wurde durch Diaphanoskopie ermittelt. Unter mikroskopischer Durchsicht wurde ein etwa 2 cm² großer kreisförmiger Bereich der Rückenhaut mit all seinen Hautschichten exzidiert, überflüssiges Bindegewebe entfernt und größere Gefäße wurden abgeklemmt. Durch diese runde Aussparung wurden die Blutgefäße der nun freiliegenden Subkutis der Gegenseite dargestellt. Während der gesamten Präparation wurde die freiliegende Subkutis durch Beträufeln mit NaCl feucht gehalten. Nun wurde die vordere Titanplatte angebracht und mit Hilfe von drei Muttern an den Schrauben der unteren Platte befestigt. Im Bereich des Präparationsareals konnte in die vordere Platte ein dünnes Glasplättchen (ø 11,7 mm, Menzel, Braunschweig, Deutschland) mit einem biegsamen Sprengring eingelegt werden und so das Präparationsareal vor Austrocknung schützen. Die beiden Titanplättchen wurden durch drei weitere Stiche aneinander fixiert. Bei Bedarf konnte das Glasplättchen entfernt werden und eine topische Applikation von Substanzen erfolgen.

Nach Implantation der Rückenhautkammer wurde das Tier für die Ausleitung der Narkose auf eine Wärmeplatte gelegt, bis es sich spontan von Seiten-in Bauchlage drehen konnte. Dann wurde es

MATERIAL UND METHODEN

zurück in den Käfig gesetzt. Alle Versuche wurden frühestens 24 Stunden nach der Kammerimplantation durchgeführt. Die Intaktheit des Kammerareals wurde regelmäßig makroskopisch und mikroskopisch überprüft. Tiere mit abnormem Blutfluss in den dargestellten Arteriolen, Anzeichen von Inflammation oder Infektion, wozu Stase, Ödembildung, Blutung sowie traumainduzierte Neovaskularisation zählen, wurden von den Versuchen ausgeschlossen (92).

Abbildung 3



Das Rückenhautkammer-Modell in der Maus. Die Rückenhautkammer besteht aus zwei korrespondierenden Titanplatten, die die Rückenhaut der Maus zwischen sich aufnehmen. Durch Exzision eines Bereiches der Haut kommen die subkutanen Gefäße zur Darstellung. Ein abnehmbares Deckglas schützt das Gewebe vor Austrocknung.

3.1.4 Implantation des arteriellen Verweilkatheters

Um eine schnelle und sichere Injektion von pharmakologisch wirksamen Substanzen oder isolierten Thrombozyten zu gewährleisten, wurde den Versuchstieren ein Verweilkatheter in die *Arteria carotis communis* implantiert. Das Tier wurde vor dem Eingriff narkotisiert und die *Regio cervicialis* großzügig enthaart. Durch vorsichtige Präparation mit einem Skalpell und einer Präparationsschere wurde unter Sicht durch das Mikroskop die rechte *Arteria carotis communis* dargestellt und von den anderen Strukturen der Carotisscheide gelöst. Mit einem nicht-resorbierbaren Faden (5-0, Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland) wurde die Arterie ligiert und anschließend weiter kranial mit einer feinen Gefäßschere durch einen kleinen Querschnitt eröffnet. Durch vorangehendes Anbringen einer Gefäßklemme wurde der Austritt von Blut verhindert. In die Öffnung wurde das Anfangsstück eines insgesamt 20 cm langen, mit NaCl entlüfteten Polyethylen-Schlauchs (0,28 mm ID, 0,61 mm OD; Smith Medical Portex, London, U.K.), welches zuvor erhitzt und durch Zug gedehnt wurde, eingeführt und bis in die Aorta vorgeschoben. Der Schlauch wurde mit zwei weiteren nicht-resorbierbaren Fäden im Gefäß fixiert, subkutan zur Rückenhaut geführt und dort ausgeleitet. Das freie Ende wurde verschlossen und aufgerollt an der Rückenhautkammer fixiert, um eine Manipulation durch das Tier zu vermeiden. Durch Aspiration wurde die korrekte intravasale Lage des Katheters wiederholt kontrolliert. Mit einer 27 Gauge-Nadel konnte der Katheter bei Bedarf kanüliert und zur Applikation verschiedener Substanzen verwendet werden.

3.1.5 Intravitalmikroskopie

Für die intravitalmikroskopischen Messungen wurden ein modifiziertes Mikroskop (Zeiss AxioTech, Vario, Oberkochen, Deutschland) und eine Lichtquelle zur Fluoreszenzbeleuchtung (X-Cite® 120Q, Exfo life sciences division, Ontario, Kanada) verwendet. Die Lichtquelle regte fluoreszierende Farbstoffe mit der jeweiligen charakteristischen Wellenlänge an, wobei durch einen Filter nur die erforderlichen Wellenbereiche des Lichts passieren konnten. Die emittierten Photonen wurden durch das optische System des Mikroskops erfasst. Die Aufzeichnung der Bilder und Filme erfolgte mit einer Digitalkamera (AxioCam HSm, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) bei definierter Belichtungszeit (60 ms). Die Auswertung wurde mit der AxioVision Software (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) durchgeführt.

Für die Dauer der Aufnahmen am Intravitalmikroskop wurden die wachen, nicht sedierten Tiere kurzzeitig in einer mit Luftlöchern versehenen Plexiglasröhre (Spezialanfertigung der Werkstatt des Instituts für Physiologie, LMU München, Deutschland) immobilisiert.

3.1.6 Isolierung und Färbung von Mausthrombozyten

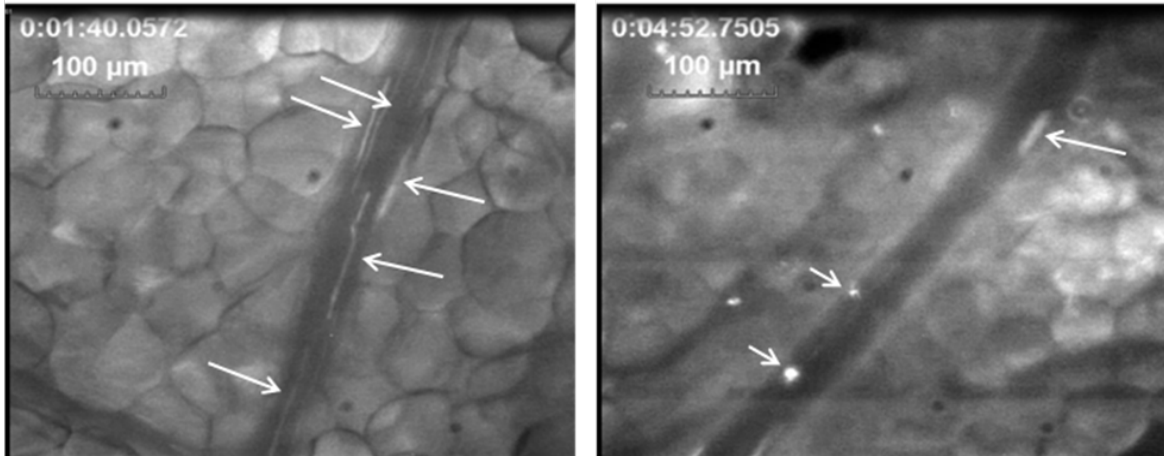
Um intravitalmikroskopisch die Interaktion von Thrombozyten mit der Gefäßwand untersuchen zu können, wurden aus einer unbehandelten Spendermaus Thrombozyten gewonnen und mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert. Dazu wurde einer narkotisierten Maus durch möglichst atraumatische kardiale Punktion mit einer 27 Gauge-Kanüle Vollblut entnommen und in einer 1ml-Spritze gesammelt. Um zu diesem Zeitpunkt die Blutgerinnung und die Thrombozytenaktivierung zu unterbinden, wurden in der Spritze Citrat-Glucose-Lösung (siehe Tabelle A2) und Iloprost (10 ng/ml) vorgelegt und nach der Blutentnahme durch leichtes Schwenken behutsam mit dem Vollblut gemischt. Das antikoagulierte Vollblut wurde bei Raumtemperatur bei 130 g für 5 Minuten zentrifugiert und in die verschiedenen Vollblutbestandteile aufgetrennt. Das gewonnene Plättchenreiche Plasma (PRP) wurde mit dem fluoreszierenden Farbstoff 5-Carboxyfluorescein-Diacetat (CFDA-SE; 17 $\mu\text{mol/l}$, Exzitationsmaximum $\lambda = 492 \text{ nm}$, Emissionsmaximum $\lambda = 517 \text{ nm}$) für 30 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Zur weiteren Isolierung der Thrombozyten wurde das PRP bei 340 g zentrifugiert, wobei zur Vermeidung einer frühzeitigen Thrombozytenaktivierung erneut Iloprost (10 ng/ml) zugegeben wurde. Der Überstand wurde verworfen und das Thrombozytenpellet in calciumfreiem Puffer mit pH 7,35 (siehe Tabelle A3) resuspendiert. Während der gesamten Isolierung der Thrombozyten wurde auf die Vermeidung sämtlicher potentiell thrombozytenaktivierender Faktoren (mechanischer Stress, Aufkommen hoher Scherkräfte durch Pipettieren und größere Temperaturschwankungen) geachtet. Thrombozytenfunktionstests mittels Aggregometrie zeigten, dass die auf diese Weise isolierten und gefärbten Thrombozyten keine relevante Voraktivierung aufweisen, und gleichzeitig ihre funktionelle Fähigkeit zur Aggregation beibehalten.

3.1.7 Analyse der Thrombozyten-Endothel-Interaktion

Vor jedem Versuch wurden die Tiere makroskopisch und mikroskopisch auf das Vorliegen eines intakten Blutflusses hin untersucht. Um die Thrombozyten-Endothel-Interaktion intravitalmikroskopisch untersuchen zu können, wurden murine Thrombozyten isoliert und mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert (siehe Kapitel 3.1.6). Diese Thrombozyten wurden

anschließend über den Carotis-Katheter appliziert. Pro Tier wurden 4–6 Gefäßabschnitte untersucht und je Gefäßabschnitt wurde ein Video von 30 Sekunden Dauer bei einer Belichtungszeit von 60 ms aufgezeichnet. Die CFDA-markierten Thrombozyten stellten sich deutlich als hell leuchtende Striche dar, deren Länge mit der Fließgeschwindigkeit korrelierte. Mit der AxioVision Software (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) wurden die Einzelbilder analysiert und die Länge der einzelnen Thrombozyten manuell gemessen. Die Fließgeschwindigkeit v eines Thrombozyten wurde nach der Formel $v = \Delta x / \Delta t$ berechnet, mit „ Δx “ = gemessene Leuchtspur des Thrombozyten [μm] und „ Δt “ = Belichtungszeit [ms]. Die Fließgeschwindigkeiten der Thrombozyten wurden graphisch in Form eines Histogramms dargestellt, um die Verteilung der Geschwindigkeiten v aller gemessenen Thrombozyten ausdrücken. Die Histogramme wurden auf die Fließgeschwindigkeit v_{\max} des schnellsten Thrombozyten des jeweiligen Gefäßabschnitts genormt, um eine systematische Verzerrung durch interarteriöle Unterschiede zu vermeiden. So drückt eine Linksverschiebung im Histogramm einen erhöhten Anteil an langsamen Thrombozyten aus, was auf eine vermehrte Interaktion mit dem Endothel hinweist. Als rollende Thrombozyten, d. h. Thrombozyten, die relevant mit dem Endothel über mechanische Bindungen interagieren, wurden Thrombozyten mit einer Geschwindigkeit von $v \leq 5 \% v_{\max}$ definiert.

Abbildung 4

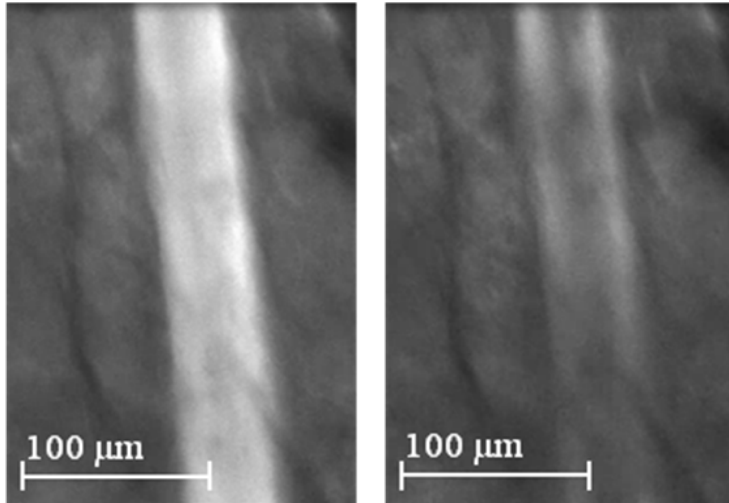


Intravitalmikroskopische Aufnahme eines Rückenhautkammergefäßes mit Darstellung der Thrombozyten-Endothel-Interaktion *in vivo*. Mausthrombozyten wurden aus einer Spendermaus isoliert, mit einem Fluoreszenzfarbstoff gefärbt und einem Empfängertier transfundiert. Die Aufnahmen zeigen die gefärbten Thrombozyten in einer Arteriole der Rückenhaut. Bei hoher Geschwindigkeit bilden die Thrombozyten „Leuchtspuren“ (langer Pfeil). Die punktförmig zur Darstellung kommenden Thrombozyten im rechten Bild (kurze Pfeile) adhäreren oder „rollen“ am Endothel.

3.1.8 Analyse der arteriolen Thrombose

Als Modell für die Bildung eines arteriellen Thrombus wurde die Methode der Fe_3Cl_2 -Superfusion verwendet und per Intravitalmikroskopie die Zeit bis zum arteriolen thrombotischen Gefäßverschluss in der Rückenhautkammer bestimmt. Dabei wurden nur Tiere mit makroskopisch und mikroskopisch intaktem Blutfluss zum Versuch herangezogen. Zunächst wurde das Deckgläschen der Rückenhautkammer entfernt, wobei das jetzt exponierte Areal der Rückenhautgefäße durch Superfusion mit NaCl feucht gehalten wurde. Eine exogene Schädigung der Gefäßwand wurde durch direkte lokale Applikation von 30 μl einer Fe_3Cl_2 -Lösung (25 mmol/l) auf die zu untersuchende Arteriole induziert. Um den bildenden Thrombus gut sichtbar darstellen zu können, wurden vor der Fe_3Cl_2 -Schädigung 50 μl einer 5-prozentigen Fluorescein-Isothyocyanat gefärbten Dextran-Lösung (FITC-Dextran) über den arteriellen Verweilkatheter appliziert. Dieser Fluoreszenzfarbstoff besitzt ein Exzitationsspektrum im blauen Bereich mit einem Maximum von $\lambda = 490 \text{ nm}$ und ein Emissionsspektrum im grünen Bereich mit einem Maximum von $\lambda = 520 \text{ nm}$. In dem geschädigten Gefäßbereich manifestierte sich der Thrombus in Form einer zunehmenden dunklen Aussparung in dem durch FITC-Dextran fluoreszierendem Plasma. Hierdurch konnte der Zeitpunkt der kompletten Stase des Blutflusses sehr genau definiert werden. Die kontinuierliche Aufzeichnung des arteriolen Blutflusses wurde kurz vor der Fe_3Cl_2 -Applikation gestartet und bei eindeutigem Erliegen des Blutflusses oder, wenn sich keine Gefäßokklusion einstellte, nach sechs Minuten beendet. Der untersuchte Gefäßabschnitt galt als verschlossen, wenn für mindestens zehn Sekunden kein Blutfluss erkennbar war.

Abbildung 5



Induktion einer Thrombusbildung durch Gefäßverletzung mit Fe₃Cl₂ *in vivo*. Nach Injektion eines Fluoreszenzfarbstoffes zur Anfärbung des Blutplasmas wird die Arteriole in der Rückenhaut durch topische Applikation mit Fe₃Cl₂ geschädigt, worauf es zur Bildung eines Thrombus kommt, der sich als dunkle Aussparungen des gefärbten Plasmas darstellt, und nach einiger Zeit die Arteriole komplett verschließt (rechtes Bild).

3.2 *In vitro* und *ex vivo* Versuche

3.2.1 Kultivierung von primären Endothelzellen

Für sämtliche Versuche in Endothelzellen wurden ausschließlich primäre Zellen verwendet. Humane Endothelzellen wurden aus Umbilikalvenen gewonnen (*human umbilical vein endothelial cells*, HUVEC). Nabelschnüre für die Isolierung der Zellen wurden freundlicherweise von der Frauenklinik des Universitätsklinikums der Ludwig-Maximilians-Universität München, von der Frauenklinik des Universitätsklinikums der Technischen Universität München und von der Frauenklinik Dr. Geisenhofer GmbH, München, zur Verfügung gestellt. Alle Spenderinnen wurden aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis zur Verwendung des Gewebes zu wissenschaftlichen Zwecken. Alle Versuche mit HUVEC stimmten mit der Deklaration von Helsinki überein.

Für die Isolierung der humanen Endothelzellen wurden die Umbilikalvenen unter sterilen Bedingungen mit warmer phosphatgepufferter Salzlösung (PBS+) (siehe Tabelle A4) gespült und anschließend mit Kollagenase A-Lösung (1 mg/ml) in einem Gefäß mit NaCl für 10 Minuten inkubiert, um die Endothelzellen von der restlichen Gefäßwand abzulösen. Anschließend wurden die Endothelzellen mit HUVEC-Wachstumsmedium aus der Nabelschnur herausgespült, bei 400 g für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Pellet wurde vorsichtig in 10 % HUVEC-Nährmedium (siehe Tabelle A5) resuspendiert und in Zellkulturflaschen mit Filter ausgesät. Die Endothelzellen wurden im Inkubator bei 37°C und 5 % CO₂ in der Umgebungsluft kultiviert. Primäre HUVEC wurden nur bis zur dritten Passage verwendet.

Aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit der Nabelschnüre wurden einige Versuche in primären porcinen Endothelzellen (*porcine aortic endothelial cells*, PAEC) durchgeführt. Diese wurden aus Schweineaorten gewonnen, die freundlicherweise vom Schlachthof München zur Verfügung gestellt wurden. Zur Isolierung der Endothelzellen wurde die Aorta zunächst von Fett- und Bindegewebe befreit und der Länge nach geöffnet. Dann wurde das Gefäß unter sterilen Bedingungen mit warmem PBS+ (siehe Tabelle A4) gewaschen und mit der Innenseite nach außen gewandt in eine Isolierkammer eingespannt. Kollagenase A-Lösung (1 mg/ml) wirkte im Inkubator bei 37°C für eine Stunde auf die Endothelzellen ein, danach konnten sie mit einem Zellschaber behutsam vom restlichen Gefäß getrennt und in Nährmedium aufgenommen werden. Durch Zentrifugation bei 400 g für 25 Minuten wurden die Endothelzellen gereinigt und anschließend in

10 % PAEC-Nährmedium (siehe Tabelle A6) resuspendiert, in Kulturschalen ausgesät und im Inkubator bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Primäre PAEC wurden bis zur neunten Passage verwendet.

Bei Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Dazu wurde das Nährmedium unter sterilen Bedingungen abgesaugt und die Zellen mit warmer, calciumfreier phosphatgepufferter Salzlösung (PBS-) (siehe Tabelle A4) gewaschen. PAEC wurden mit Trypsin-EDTA-Lösung (0,05 % Trypsin und 0,02 % EDTA) (1 ml, 2 min), HUVEC mit Akutase (5 min) von der Zellschale gelockert und noch haftende Zellen mit einem Zellschaber sanft abgelöst. Die Endothelzellen wurden in frischem Nährmedium resuspendiert und im Verhältnis 1:2 bis 1:6 auf frische Zellschalen ausgesät.

3.2.2 Proteinnachweis mit Gel-Elektrophorese und *Western blot*

Ein etabliertes Verfahren zum Nachweis bestimmter Proteine ist der *western blot*. Dabei werden zunächst Proteine gewonnen, etwa durch Lyse, und die gewonnenen Proteine werden per Gelelektrophorese im elektrischen Feld aufgetrennt. Danach werden die Proteine auf eine Membran überführt, und können nun weiter analysiert werden. Spezifische Antikörper können an bestimmte Proteine binden und ermöglichen mithilfe von Chemilumineszenz ihre Detektion und Darstellung.

3.2.2.1 Herstellen von Zelllysaten für *Western blot*

Für die Gewinnung von Lysaten aus Endothelzellen wurde Lysepuffer (siehe Tabelle A7) (300 µl für Schalen mit 10 cm Durchmesser) auf den Zellrasen gegeben, nachdem die Schale zuvor mit eiskaltem PBS+ (siehe Tabelle A4) gewaschen wurde. Vor Verwendung des Lysepuffers wurde diesem Natriumorthovanadat (Na₃VO₄), ein unspezifischer Inhibitor von Tyrosinphosphatasen, zugefügt. Dazu erfolgte zunächst eine Aktivierung von Natriummetavanadat (NaVO₃) zu Natriumorthovanadat (Na₃VO₄) durch Depolymerisierung. NaVO₃ wurde in einer Konzentration von 200 mmol/l in Aqua dest. gelöst und auf einen pH-Wert von 10,0 eingestellt. Die gelbe Lösung wurde solange gekocht, bis keine Färbung mehr zu erkennen war. Nach Abkühlung wurde der pH-Wert erneut auf 10,0 titriert. Diese Schritte wurden solange wiederholt, bis die Lösung unabhängig von der Temperatur farblos blieb. Die Lösung wurde in Aliquots gefüllt und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

Die Zellschalen wurden mit dem Lysepuffer für mindestens 10 Minuten bei -20°C eingefroren und danach wieder langsam auf Eis aufgetaut. Mit einem Zellschaber wurden die Zellen von der Schale gelöst, durch mehrmaliges Ziehen durch eine 29 Gauge-Nadel wurde ihre Zellintegrität zusätzlich mechanisch zerstört. Während der gesamten Prozedur wurden die Zellen auf Eis gelagert. Durch Zentrifugation bei 4°C (10.000 g, 10 min) wurden Proteinlysate und Zelldebris voneinander getrennt und der Überstand wurde bis zur Verwendung bei -20°C eingefroren.

3.2.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration in Zelllysaten

Die Proteinkonzentration in Zelllysaten wurde photometrisch mit Hilfe eines BCA (Bicinchoninsäure) Protein Assay Reagenz Kits bestimmt. Polypeptide reduzieren dabei in wässrig-alkalischer Lösung zweiwertige Kupferionen unter Bildung von violetten Protein-Kupferkomplexen zu einwertigen Ionen. Die Farbintensität der Proben steigt annähernd linear mit der Proteinkonzentration im Lysat an und wird mit einer Eichreihe bekannter Proteinkonzentration verglichen. Das violette Reaktionsprodukt entsteht durch die Chelierung zweier Moleküle BCA mit einem Cu^{1+} -Ion und wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen. In Triplikaten wurden je 10 µl der Probe in eine 96-Well-Platte pipettiert und je 200 µl der BCA-Lösung zugefügt, danach wurden die Platten bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Zur Erstellung einer Eichkurve diente eine Verdünnungsreihe mit bekannten Proteinkonzentrationen (0-20 mg/ml Bovines Serumalbumin (BSA) in Aqua dest.). Die Proteinkonzentration der Proben wurde anhand der Formel $y = m x + t$ bzw. $x = (y - t) / m$ berechnet, mit „m“ = Steigung der Eichgerade [ml/mg], „t“ = Schnittpunkt der Eichgerade mit der y-Achse und „y“ = gemessene Absorption. „x“ entspricht dem gesuchten Proteingehalt in mg/ml.

3.2.2.3 Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Proteine anhand ihrer elektrophoretischen Mobilität erfolgte in SDS-Polyacrylamid-Gelen (4 % Trenngel und 10 % Sammelgel, siehe Tabelle A8). Die Gele wurden zunächst in noch flüssiger Form zwischen zwei Glasplatten gefüllt, wobei ein Probenkamm zur Freihaltung der späteren Proben Taschen in das Sammelgel gesteckt wurde. Der Kamm wurde nach der Auspolymerisation vorsichtig entfernt. Bevor die Proteine in die Taschen aufgetragen werden konnten, wurden sie durch Zugabe von Ladepuffer (siehe Tabelle A9) im Verhältnis 3:4 und Aufkochen bei 100°C für 5 Minuten denaturiert. Damit die Größe der Proteine später eingeordnet werden konnte, wurde zusätzlich ein Farbmarker, bestehend aus Proteinen bekannter Größe, als

Referenz auf das Gel aufgetragen. Das Gel wurde in der Elektrophoresekammer komplett von 1x Laufpuffer (siehe Tabelle A10) bedeckt. Es wurde eine Spannung von 100 V für das Sammelgel und von 200 V für das Trenngel angelegt. Die Elektrophorese wurde gestoppt, als die kleinsten (und damit am schnellsten wandernden) Proteine noch ca. 1,5 cm vom Unterrand des Gels entfernt waren.

3.2.2.4 Blotting

Durch *tank blotting* wurden die im Gel befindlichen Proteine durch Anlegen eines senkrecht zum Gel gerichteten elektrischen Feldes auf eine Nitrozellulosemembran überführt. Dazu wurde die Membran zunächst in Transferpuffer (siehe Tabelle A11) getränkt und auf ein feuchtes Filterpapier gelegt. Darauf wurde das Trenngel positioniert, und den Abschluss bildete wieder ein feuchtes Filterpapier. Zwischen den einzelnen Schichten befindliche Luftblasen wurden mit einem runden Glasstab ausgestrichen. Die Anordnung wurde zwischen zwei feuchte Schwämme gelegt, in der *blotting* Kammer fixiert und mit Transferpuffer bedeckt. Bei einer Spannung von 50 V wurde für 2 Stunden geblottet, danach waren die Proteine auf die Nitrozellulosemembran transferiert.

3.2.2.5 Proteinnachweis durch Antikörper und Chemilumineszenz

Nach dem *blotting* wurde die Membran mit den Proteinen für 1 Stunde in *Blocking* Puffer mit Bovinem Serumalbumin (siehe Tabelle A12) gelegt, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, und anschließend über Nacht bei 4°C mit verdünntem Erst-Antikörper (siehe Tabelle A24) bedeckt. Die Membran wurde drei Mal für je 5 Minuten mit TBS/T (siehe Tabelle A13) auf dem Schüttler gewaschen, um überschüssigen, nicht gebundenen Erst-Antikörper zu entfernen. Anschließend wurde die Membran mit dem entsprechenden Zweit-Antikörper (siehe Tabelle A24) bei Raumtemperatur für mindestens eine Stunde auf dem Schüttler inkubiert und erneut mit TBS/T drei Mal gewaschen. Der Zweit-Antikörper ist an Peroxidase gebunden, deren enzymatische Aktivität nach Zugabe eines Chemilumineszenzkits mit Luminol und H₂O₂ (Entwicklungsreagenz, siehe Tabelle A14) mit einer digitalen Kamera detektiert wurde. Die weitere Auswertung der Proteinbanden erfolgte über Messung der jeweiligen Dichte mit der Wasabi Software (Hamamatsu, Hamamatsu, Japan). Das nachgewiesene Zielprotein wurde in Relation zu GAPDH (sog. *housekeeping protein*) gesetzt.

3.2.3 Durchflusszytometrie

Mittels Durchflusszytometrie wurde die Anwesenheit der Adhäsionsmoleküle P-Selectin und von Willebrand Faktor (vWF) auf der Zelloberfläche detektiert. Bei diesem Verfahren passieren die in Suspension befindlichen intakten Zellen einzeln nacheinander einen fokussierten Laserstrahl, dabei entsteht Streulicht. Dieses Signal wird durch die Parameter *forward scatter* (FSC) und *side scatter* (SSC) charakterisiert, welche von der Größe bzw. der internen Komplexität der analysierten Zelle bestimmt werden. Das Durchflusszytometer ist darüber hinaus in der Lage, Fluoreszenzsignale zu erfassen. Die Endothelzellen wurden mit fluoreszierenden Antikörpern gegen die zu detektierenden Oberflächenmoleküle markiert.

In dieser Arbeit wurden die Endothelzellen 24 Stunden vor Versuch auf 1 % Nährmedium (siehe Tabelle A5) gesetzt und danach wie im Ergebnisteil angegeben (siehe Kapitel 4.5) stimuliert. Nach einmaligem Waschen mit PBS- (siehe Tabelle A4) wurden die Zellen mit Akutase von der Zellschale gelöst und in Reagenzgefäße überführt. Durch Zentrifugieren bei 400 g für 2 Minuten wurden die Zellen vom Überstand getrennt. Das Pellet wurde in 200 µl 4-prozentiger Formaldehyd-Lösung resuspendiert und die Zellen wurden 10 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurde das überschüssige Formalin durch Waschen mit PBS+ (siehe Tabelle A4) entfernt und die Zellen wurden in 100 µl Antikörperlösung (fluoreszenzmarkierter Erst-Antikörper bzw. fluoreszenzmarkierte Isotypkontrolle, siehe Tabelle A25) für 30 Minuten bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Vor der Messung wurden die Zellen gewaschen und die Zellsuspension in FACS-Röhrchen überführt. Die Analyse wurde an einem Durchflusszytometer FACSCanto II durchgeführt, die Auswertung erfolgte mittels FACSDiva Software (beides Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA).

3.2.4 Messung der SHP-1-Phosphatase-Aktivität

Phosphatasen wie die SHP-1 sind Enzyme, deren Funktion darin besteht, Phosphatgruppen anderer Proteine abzuspalten. Die Phosphatase-Aktivität der SHP-1 wurde anhand eines photometrischen Assays bestimmt, bei dem para-Nitrophenylphosphat (pNPP) als Substrat dient. Nach Abspaltung der Phosphatgruppe entsteht ein gelbliches, wasserlösliches Produkt, das mittels *ELISA-Reader* ausgewertet werden kann.

3.2.4.1 Immunpräzipitation

Als erster Schritt musste die SHP-1 mittels Immunpräzipitation aus Zelllysaten isoliert werden. Die Immunpräzipitation ist ein Verfahren, um ein bestimmtes Protein aus einem Proteingemisch zu isolieren. Hierbei wird ein spezifischer Antikörper, der gegen das zu isolierende Protein gerichtet ist, in das Zelllysate gegeben. Nun werden magnetische *MicroBeads* an den Immunkomplex gekoppelt. Das gesuchte Protein, welches dadurch magnetisch markiert ist, wird durch magnetische Säulen aus dem Proteingemisch getrennt.

Zur Herstellung von Zelllysaten aus Endothelzellen für die Immunpräzipitation wurden 300 µl eines Lysepuffers (siehe Tabelle A15) pro Zellschale mit 10 cm Durchmesser verwendet. 500 µg Protein (Bestimmung der Proteinkonzentration siehe Kapitel 3.2.2.2) wurden zunächst in einem Reagenzgefäß mit einem Erst-Antikörper (0,5 µg/100 µg Protein) (siehe Tabelle A24) bei 4°C für 2 Stunden auf einem Rotator inkubiert. Nach Zugabe von 75 µl magnetischer Protein G-Beads wurden die Proben erneut bei 4°C über Nacht inkubiert. Zur Isolierung der Proteine wurden Säulen mit einem Filter (MACS Trennsäulen, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) verwendet, die auf einem passenden Magneten installiert wurden. Vor dem Auftragen der Immunkomplex-Lösung wurden die Säulen zwei Mal mit Waschpuffer (siehe Tabelle A16) gespült. Nach dem Auftragen der Proben blieben die magnetisch markierten Immunkomplexe in den Säulen hängen, während die übrigen Proteine (Eluat) frei durch die Säulen hindurchlaufen konnten. Um das festgehaltene Zielprotein zu gewinnen, wurden die Säulen anschließend vom Magneten heruntergenommen, und die Immunkomplexe konnten mit Phosphatasepuffer (siehe Tabelle A17) aus den Säulen herausgespült werden. So lag nun das isolierte, an die Magnetbeads gebundene Zielprotein vor.

Falls das isolierte SHP-1-Protein nicht für eine Aktivitätsmessung, sondern für einen *western blot* verwendet werden sollte, so wurden die Säulen nach Auswaschen des Eluats zunächst auf den Magneten belassen und mit 10 µl des auf 95°C erhitzten 4x Ladepuffers (siehe Tabelle A9) inkubiert, um die Bindung des Immunkomplexes mit den Protein G-Beads zu lösen. Nach 5 Minuten wurden weitere 20 µl des heißen 4x Ladepuffers aufgetragen und das präzipitierte Protein in einem Reagenzgefäß aufgefangen. Im Folgenden wurde das Protein auf ein SDS-PAGE-Gel aufgetragen, geblottet und durch Chemilumineszenz dargestellt (siehe Kapitel 3.2.2).

3.2.4.2 Photometrischer Aktivitätsassay

Die Phosphatase-Aktivität der SHP-1 wurde anhand eines photometrischen Assays bestimmt. Die SHP-1 wurde mittels Immunpräzipitation isoliert (siehe Kapitel 3.2.4.1), und mit 110 µl einer 10 mmol/l para-Nitrophenylphosphat-Lösung (pNPP-Lösung, siehe Tabelle A18) bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Die SHP-1 spaltet als Phosphatase den Phosphatrest des farblosen p-Nitrophenylphosphats ab. Bei dieser Reaktion entsteht gelbliches p-Nitrophenol. Nach der Inkubation mit pNPP wurden die Proben erneut auf die am Magneten befindlichen Säulen aufgetragen, um das farbige Produkt von den Immunkomplexen zu trennen. 100 µl des farbigen Reaktionsproduktes wurden in eine 96-Well-Platte pipettiert. Photometrisch (SpectraFluor, Tecan, Crailsheim, Deutschland) wurde die Extinktion bei 405 nm gemessen, die annähernd linear mit der Farbintensität der Proben und somit der Phosphataseaktivität der SHP-1 korreliert.

Als Kontrolle wurde der SHP-1-Immunkomplex anschließend mit dem Phosphataseinhibitor Na_3VO_4 (20 mmol/l) (siehe Kapitel 3.2.2.1) für 30 Minuten bei 37°C behandelt und anschließend erneut wie oben beschrieben mit pNPP inkubiert und photometrisch gemessen. Hierdurch konnte gezeigt werden, dass die Farbreaktion tatsächlich durch die Phosphataseaktivität der SHP-1 bedingt war.

3.2.5 Thrombozytenaggregometrie

Die Thrombozytenaggregometrie untersucht die Aggregation von Thrombozyten. Es gibt verschiedene physikalische Messprinzipien, welche für verschiedenes Probenmaterial (z. B. Vollblut oder plättchenreiches Plasma (PRP)) unterschiedlich gut geeignet sind. Im Rahmen dieser Arbeit kamen sowohl die Lichttransmissionsaggregometrie (Born-Aggregometrie) als auch die Impedanzaggregometrie (Multiplate-Assay) zur Anwendung.

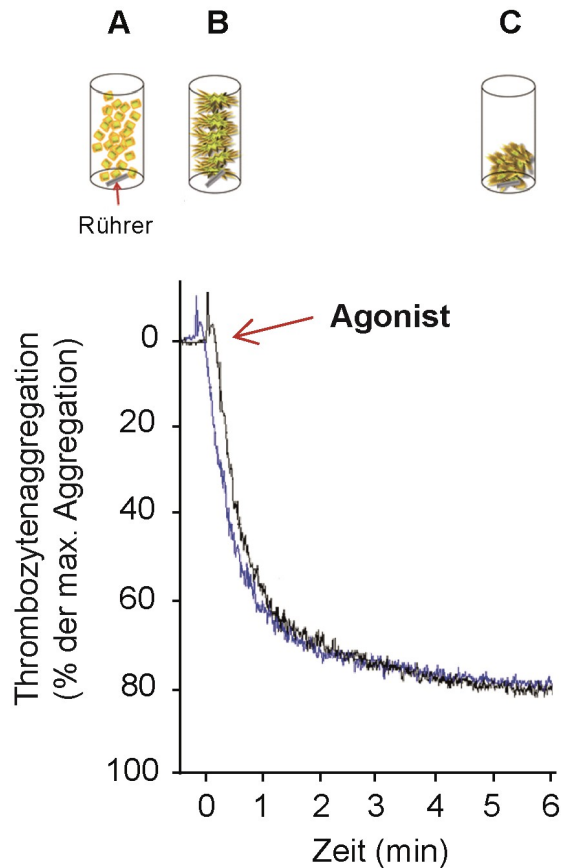
3.2.5.1 Lichttransmissionsaggregometrie nach Born

Bei der Lichttransmissionsaggregometrie findet die Messung in thrombozytenreichem Plasma (PRP) statt. PRP wird durch die Zentrifugation von Vollblut mit 100 – 300 g gewonnen, wobei das Blut in zwei Phasen aufgetrennt wird. Die obere Phase, das PRP, enthält Thrombozyten in der physiologischen Konzentration von 150.000 – 400.000 /µl, während Erythrozyten und Leukozyten die untere Phase bilden. Die Bestimmung der Thrombozytenaggregation in PRP beruht auf der Messung der Lichtdurchlässigkeit der Probe (Lichttransmissionsaggregometrie). Born beschrieb

MATERIAL UND METHODEN

1962 diese turbidimetrische Methode, bei der durch einen das PRP durchdringenden Infrarotstrahl dessen Trübheit bestimmt wird (93). Nach Stimulation des PRP mit einem Thrombozytenagonisten kommt es zur Bildung größerer Thrombozytenaggregate. Die Trübheit des PRP nimmt mit zunehmender Aggregation ab und es durchdringt ein größerer Anteil des ausgesandten Infrarotstrahls die Probe. Das passierte Licht korreliert direkt proportional mit dem Anteil der Aggregation. Als Referenzprobe diente plättchenarmes Plasma (PPP).

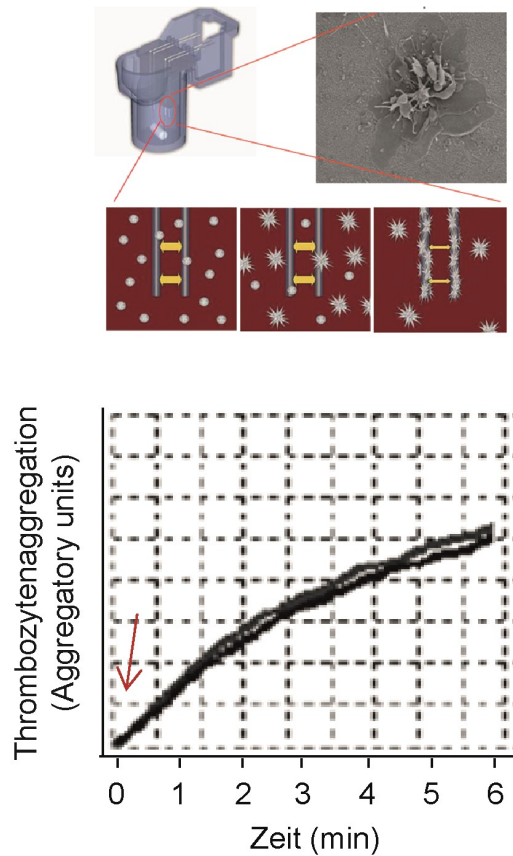
Für die Gewinnung von PRP wurde gesunden, freiwilligen Probanden Blut entnommen, wobei von allen Spendern eine schriftliche Einwilligung eingeholt wurde. Zur Verhinderung einer frühzeitigen Blutgerinnung wurde 10 Vol.% Natriumcitrat-Lösung verwendet. Das Blut wurde vorsichtig bei 130 g für 15 Minuten ohne Bremse zentrifugiert und anschließend die oberste Schicht, also das PRP, behutsam mit einer breiten Plastikpipette abgenommen. 400 µl wurden nach entsprechender Stimulation (siehe Kapitel 4.6.1) in eine Messküvette überführt und bei 37°C an einem 2-Kanal-Aggregometer (ChronoLog 490-2D, Havertown, USA) gemessen. Die Aggregation wurde durch Zugabe eines Agonisten (Collagen, ADP oder TRAP) gestartet, wobei die Probe kontinuierlich mit einem kleinen Metallrührer bei 1000 rpm durchmischt wurde. Als Referenzprobe diente PPP, welches durch Zentrifugation von PRP bei 2000 g für 5 Minuten gewonnen wurde. Die Aggregation wurde für mindestens 6 Minuten nach Zugabe des Agonisten aufgezeichnet und die maximale Aggregation in Prozent wurde mit der Aggrolink Software (ChronoLog, Havertown, USA) ausgewertet.

Abbildung 6

Thrombozytenaggregation in PRP (Lichttransmissionsaggregometrie). PRP wird unter ständigem Rühren in einer Küvette einem Lichtstrahl ausgesetzt, wobei ein Detektor dahinter die Transmission erfasst. Die Transmission verhält sich proportional zur Aggregation und wird gegen die Zeit aufgetragen. (A) Zunächst wird die Transmission des PRP im ruhenden Zustand erfasst (Nulllinie). (B) Nach Zugabe eines Thrombozytenagonisten (z. B. ADP oder Collagen, Pfeil) kommt es zur Formveränderung mit Oberflächenzunahme der Thrombozyten und die Transmission nimmt vorübergehend ab. (C) Durch das Eintreten der Thrombozytenaggregation nimmt die Lichttransmission schließlich zu und spiegelt den Grad der Aggregation wieder. Modifiziert nach Santos-Martinez et al. 2011 (94).

3.2.5.2 Impedanzaggregometrie im Vollblut der Maus

Bei der Impedanzaggregometrie findet die Messung der Thrombozytenaggregation im Vollblut statt. Die Bestimmung der Thrombozytenaggregation beruht auf der Messung des Widerstands zwischen zwei Elektroden, die in spezielle Reaktionsküvetten hineinragen. Nach Aktivierung der Thrombozyten durch einen Thrombozytenagonisten (z. B. ADP) und folgender Thrombozytenaggregation an den Elektroden steigt dort proportional zum Grad der Aggregation auch der elektrische Widerstand (die Impedanz). Diese Veränderungen werden als AU (*arbitrary units*) ausgedrückt gegen die Zeit aufgetragen und graphisch dargestellt (Multiplate-Analyzer, Dynabyte, München, Deutschland). Für die Impedanzaggregometrie wurde Mäusen in Narkose über die *Vena cava inferior* mit einer heparinisierten Spritze Blut entnommen. Die Messungen nach dem Multiplate Assay erfolgten nach Angabe des Herstellers bei 37°C, es wurden jeweils Duplikate gemessen. Die Aggregation wurde durch Zugabe des Thrombozytenagonisten ADP gestartet, für 6 Minuten aufgezeichnet und mit der entsprechenden vom Hersteller zur Verfügung gestellten Software ausgewertet.

Abbildung 7

Thrombozytenaggregation in Vollblut (Impedanzaggregometrie). Antikoaguliertes Vollblut wird unter ständigem Rühren in einer speziellen Küvette (oben links) mit einem Thrombozytenagonisten (z. B. ADP) stimuliert. Währenddessen wird an zwei in die Küvette ragenden Elektroden der elektrische Widerstand gemessen. Mit zunehmender Anlagerung der Thrombozyten an die Elektroden (2. Reihe von oben) kommt es zu einem Anstieg der Impedanz, welche graphisch gegen die Zeit aufgetragen wird und den Grad der Aggregation widerspiegelt (unten). Aus: Calatzis, Loreth, Spannagl 2007 (95).

3.3 Graphische Darstellung und statistische Analyse

Die erhobenen Daten wurden mit der SigmaPlot Software (Version 11.0) analysiert und graphisch dargestellt. Das Erstellen der Abbildungen erfolgte mit Adobe Illustrator Software und Microsoft Powerpoint.

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit der in SigmaPlot integrierten SigmaStat Software. Bei normalverteilten Werten wurde der Student's t-test für den Vergleich von zwei Gruppen und die Varianzanalyse (ANOVA) für den Vergleich mehrerer Gruppen verwendet. Bei nicht normalverteilten Werten wurde der Mann-Whitney Rangsummentest für den Vergleich von zwei Gruppen und der Kruskal-Wallis-Test (ANOVA on ranks) für den Vergleich mehrerer Gruppen verwendet. Alle Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm Standardfehler dargestellt. Die Ergebnisse wurden als signifikant erklärt, wenn die Fehlerwahrscheinlichkeit $p < 0,05$ war.

4 ERGEBNISSE

4.1 *In vivo* Applikation von TNF α und Natrium Stibogluconate

Zur Induktion einer systemischen Inflammation wurde Wildtyp C57BL/6 Mäusen systemisch (intravasal) murines TNF α appliziert. In Anlehnung an Konzentrationen, welche in Vorarbeiten *in vitro* proinflammatorische Effekte in Endothelzellen induziert hatten (39), wurde TNF α gewichtsadaptiert so appliziert (siehe Kapitel 3.1.2), dass primär eine Konzentration im Blut von 5 ng/ml erreicht wurde. Kontrolltieren wurde das entsprechende Volumen an Trägerlösung (NaCl) appliziert. Experimente wurden vier Stunden nach Applikation von TNF α durchgeführt.

Die Hemmung der Tyrosinphosphatase SHP-1 erfolgte durch intravasale Applikation von Natrium Stibogluconate 30 Minuten vor Durchführung der Experimente. Die Substanz wurde gewichtsadaptiert so verabreicht (siehe Kapitel 3.1.2), dass primär eine Konzentration im Blut von 10 μ g/ml (11 μ mol/l) erreicht wurde. Für diese Konzentration wurde eine hohe Spezifität für die Tyrosinphosphatase SHP-1 gezeigt (83). Kontrolltieren wurde das entsprechende Volumen an Trägerlösung (NaCl) appliziert.

4.2 Thrombozyten-Endothel-Interaktion *in vivo*

Die Interaktion von isolierten, gefärbten und anschließend injizierten Thrombozyten mit der Gefäßwand wurde intravitalmikroskopisch in Arteriolen der Rückenhautkammer analysiert. Die untersuchten Arteriolen hatten einen Durchmesser von 40 bis 120 μ m und unterschieden sich nicht zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen. Die Blutflussgeschwindigkeit in den Arteriolen wurde durch die TNF α -induzierte Inflammation oder durch die SHP-1 Hemmung mit Natrium Stibogluconate nicht signifikant beeinflusst (siehe Tabelle 1).

ERGEBNISSE

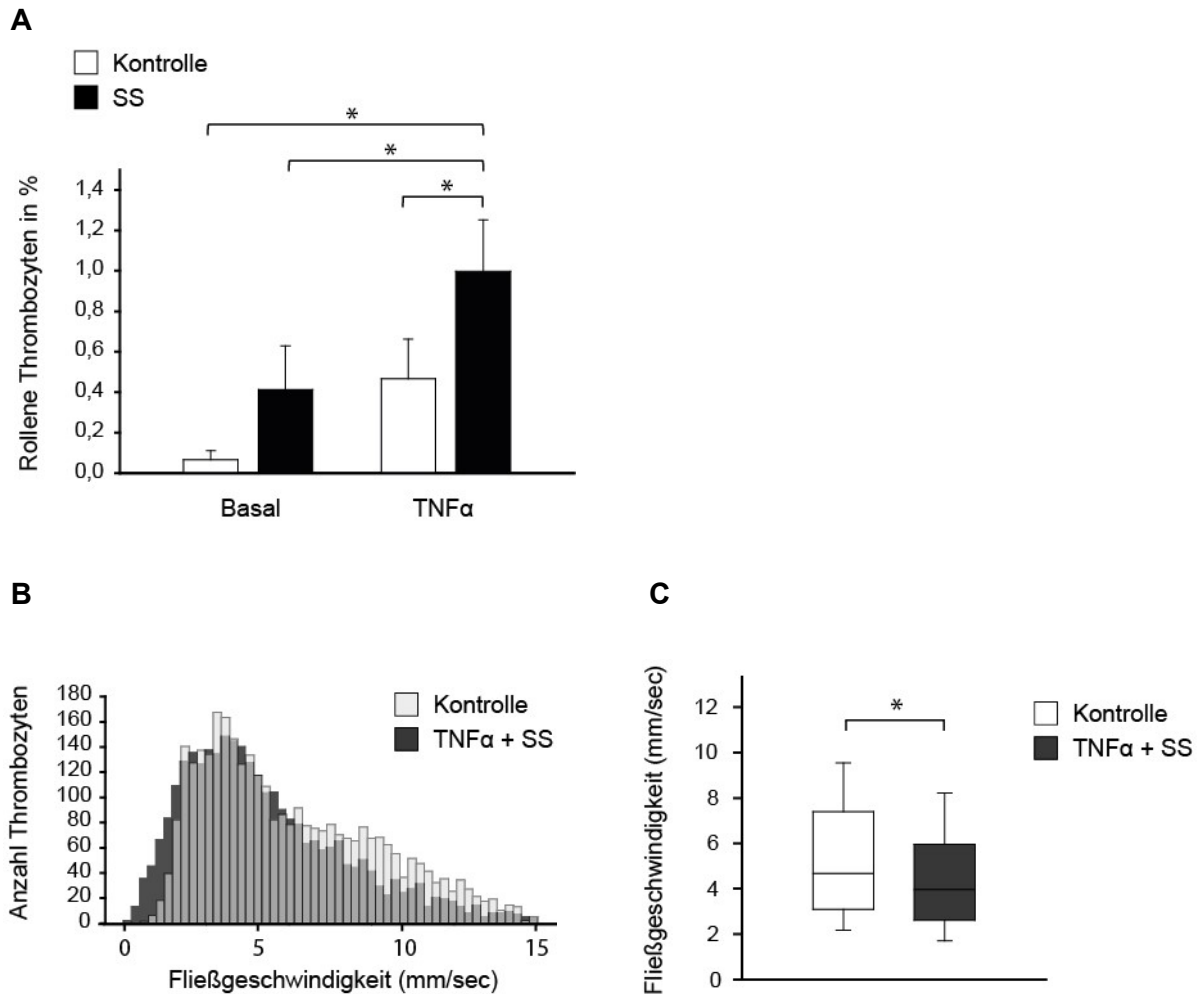
Tabelle 1: Hämodynamische Parameter der untersuchten Arteriolen der Rückenhaut

TNFα	SS	n Tiere	n Gefäße	Durchmesser (μm)	Blutfluss (mm/s)
-	-	5	34	61 \pm 12	8,9 \pm 3,2
-	+	5	33	69 \pm 20	8,9 \pm 3,6
+	-	5	38	63 \pm 10	11,1 \pm 3,3
+	+	5	33	78 \pm 14	10,4 \pm 3,9

SS: Natrium Stibogluconate

Die systemische Behandlung mit Natrium Stibogluconate führte zu keinem signifikanten Anstieg von rollenden Thrombozyten unter physiologischen Bedingungen (0,4 % \pm 0,2 % aller analysierten Thrombozyten versus 0,1 % \pm 0,1 %, $p = 0,12$, $n = 33\text{-}34$ Arteriolen aus insgesamt 5 Tieren pro Gruppe). Erfolgte die SHP-1 Hemmung in einem TNF α -induzierten inflammatorischen Setting, kam es zu einer signifikanten Erhöhung der Fraktion rollender Thrombozyten (1,0 % \pm 0,3 % versus 0,4 % \pm 0,2 % ohne Inhibition der SHP-1, $p < 0,05$, $n = 33\text{-}38$ Arteriolen aus insgesamt 5 Tieren pro Gruppe, siehe Abbildung 8A). Die Hemmung der SHP-1 mit Natrium Stibogluconate in TNF α -induzierter Inflammation führte zu einer Abnahme der Fließgeschwindigkeit der Thrombozyten ($p < 0,05$, $n = 2900\text{-}3300$ Thrombozyten aus 33-38 Gefäßabschnitte aus insgesamt 5 Tieren pro Gruppe). Eine vermehrte Thrombozyten-Endothel-Interaktion nach Hemmung von SHP-1 in der TNF α -induzierten Inflammation zeigt sich auch im Histogramm der Fließgeschwindigkeiten aller Thrombozyten im Sinne einer Linksverschiebung zugunsten von mehr langsamen oder ganz langsamen (rollenden) Thrombozyten (siehe Abbildungen 8B und 8C).

Abbildung 8



Hemmung der SHP-1 führt zu vermehrter Thrombozyten-Endothel-Interaktion in TNFα-induzierter Entzündung *in vivo*. Die Thrombozyten-Endothel-Interaktion wurde intravitalmikroskopisch im Rückenhautkammermodell in der Maus untersucht. Eine systemische Inflammation wurde durch TNFα 5 ng/ml (4 h vor Versuch) induziert, die SHP-1 Hemmung erfolgte mit Natrium Stibogluconate 10 µg/ml (30 min vor Versuch). (A) Anteil der rollenden Thrombozyten (definiert als Thrombozyten mit einer Fließgeschwindigkeit < 5 % der Blutflussgeschwindigkeit). (B) Häufigkeitshistogramm der Fließgeschwindigkeiten aller Thrombozyten. (C) Mittlere Thrombozyten-Fließgeschwindigkeiten. * $p < 0,05$, $n = 2900-3300$ Thrombozyten, 33-38 Gefäßabschnitte, je 5 Tiere pro Gruppe. SS: Natrium Stibogluconate.

4.3 Arteriöläre Thrombose *in vivo*

Um den Einfluss der SHP-1 Hemmung auf arteriöläre Thrombose *in vivo* zu untersuchen, wurde im Rückenhautkammermodell in der Maus intravitalmikroskopisch die Thrombusbildung nach Verletzung von Arteriolen mit Fe₃Cl₂ analysiert.

Die untersuchten Arteriolen hatten einen Durchmesser von 80 bis 118 µm und unterschieden sich nicht zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen. Die durch die Gefäßverletzung induzierte Vasokonstriktion der Arteriolen lag im Mittel bei 44 % ± 24 % und wurde durch die TNFα-induzierte Inflammation oder durch die SHP-1 Hemmung mit Natrium Stibogluconate nicht signifikant beeinflusst (p = 0,07 für TNFα vs. unbehandelt, p = 0,12 für TNFα vs. TNFα + SHP-1 Hemmung, n = 6 pro Gruppe, siehe Tabelle 2).

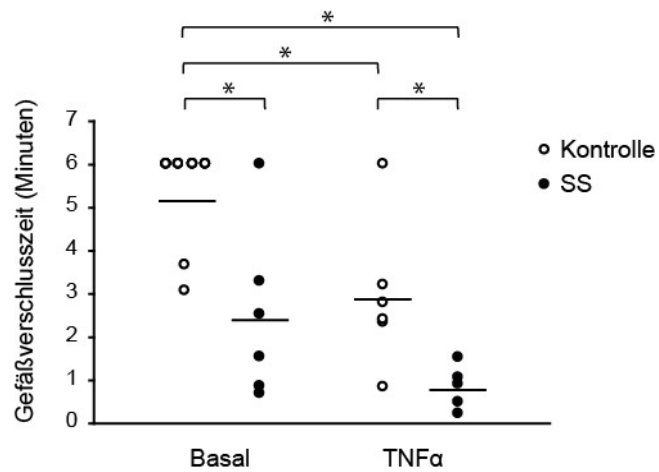
Tabelle 2: Hämodynamische Parameter der untersuchten Arteriolen der Rückenhaut

TNFα	SS	n Tiere	Durchmesser (µm)	Vasokonstriktion (%)
-	-	6	107 ± 9	37 ± 21
-	+	6	101 ± 12	43 ± 31
+	-	6	99 ± 12	58 ± 15
+	+	6	109 ± 7	38 ± 25

SS: Natrium Stibogluconate

Die Zeit von der Verletzung bis zum kompletten thrombotischen Gefäßverschluss wurde durch Hemmung der SHP-1 von 307 ± 34 sec auf 149 ± 49 sec verkürzt (p < 0,05, n = 6 Tiere pro Gruppe). Nach Induktion einer systemischen Inflammation durch TNFα lag die thrombotische Gefäßverschlusszeit bei 176 ± 42 sec (p < 0,05 vs. Kontrolle, n = 6 Tiere pro Gruppe) und wurde in diesem Setting durch zusätzliche Hemmung der SHP-1 durch Natrium Stibogluconate sogar auf 50 ± 14 sec verkürzt (p < 0,05 vs. TNFα, n = 6 Tiere pro Gruppe, siehe Abbildung 9).

Abbildung 9



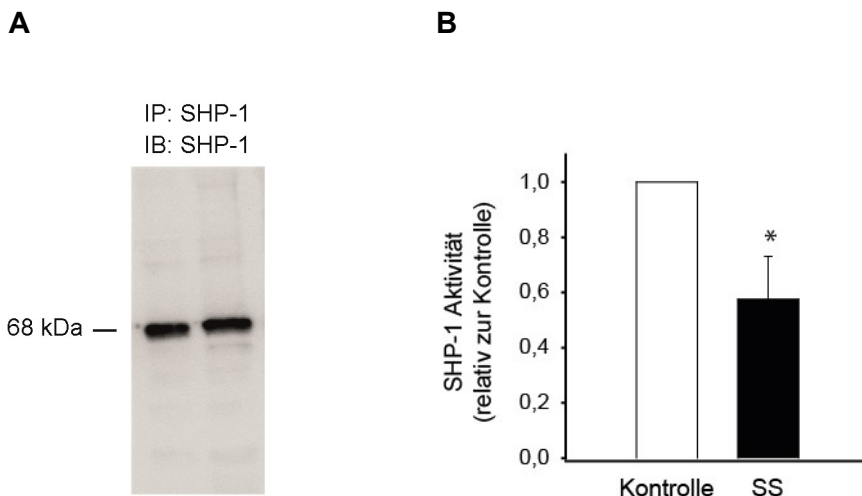
Hemmung der SHP-1 führt zu beschleunigter Thrombusbildung in TNF α -induzierter Entzündung *in vivo*. Die arterioläre Thrombusbildung wurde intravitalmikroskopisch im Rückenhautkammermodell in der Maus untersucht. Eine systemische Inflammation wurde durch TNF α 5 ng/ml (4 h vor Versuch) induziert, die SHP-1 Hemmung erfolgte mit Natrium Stibogluconate 10 μ g/ml (30 min vor Versuch). * $p < 0,05$, $n = 6$ Tiere pro Gruppe.

4.4 SHP-1 Hemmung in Endothelzellen *in vitro*

Sodium Stibugluconate (SS) hemmt die Aktivität von Phosphatasen und ist in einer Konzentration von 10 µg/ml spezifisch für die SHP-1, wie Pathak et al. zeigen konnten (83).

Die Wirksamkeit von Natrium Stibogluconate in Bezug auf die SHP-1 Hemmung in Endothelzellen wurde mittels eines Phosphatase-Aktivitätsassays untersucht. Hierzu erfolgte zunächst die Immunpräzipitation des Proteins aus Lysaten von primären humanen Endothelzellen (HUVEC, siehe Abbildung 10A). Durch Behandlung mit Natrium Stibogluconate 10 µg/ml für 30 Minuten konnte die SHP-1-Phosphatase-Aktivität auf 58 % ± 15% der Basalaktivität einer unbehandelten Kontrolle gesenkt werden ($p < 0,05$, $n = 7-8$, siehe Abbildung 10B).

Abbildung 10



Sodium Stibugluconate führt zur effektiven Hemmung der SHP-1 in primären humanen Endothelzellen (HUVEC). (A) SHP-1 wurde mittels Immunpräzipitation aus Endothelzelllysaten aufgereinigt (repräsentativer *western blot*). (B) SHP-1-Aktivität gemessen mittels photometrischem Phosphatase-Aktivitätsassay nach Behandlung von Endothelzellen mit Natrium Stibogluconate (SS, 10 µg/ml, 30 min). * $p < 0,05$, $n = 7-8$ pro Gruppe.

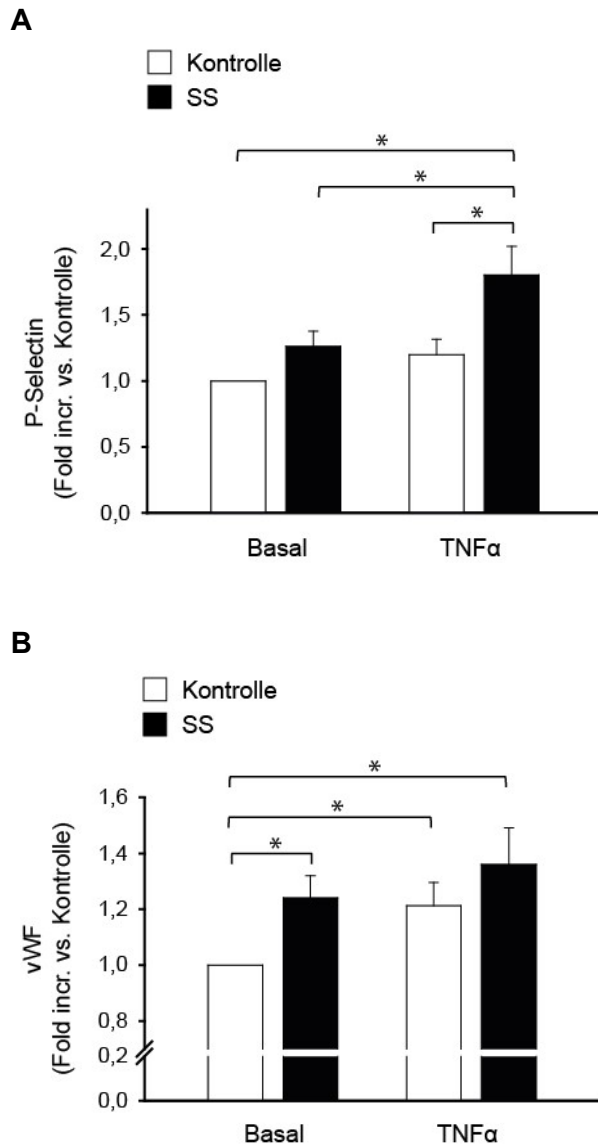
4.5 Oberflächenexpression endothelialer Adhäsionsmoleküle

Als nächstes sollten Effekte der SHP-1 Hemmung auf Endothelzellen untersucht werden, die zu einer vermehrten Thrombozyten-Endothel-Interaktion und Thrombusbildung beitragen könnten. Hierzu wurde *in vitro* in kultivierten primären humanen Endothelzellen (HUVEC) die Oberflächenexpression verschiedener Adhäsionsmoleküle, die an der Thrombozyten-Endothel-Interaktion beteiligt sind, mittels Durchflusszytometrie analysiert. Analog zu den *in vivo* Experimenten wurde der Einfluss der SHP-1 Hemmung zunächst unter basalen Bedingungen untersucht (Natrium Stibogluconate, 10 µg/ml, 30 min). In einem zweiten Ansatz wurde die Rolle der SHP-1 Hemmung unter inflammatorischen Bedingungen untersucht, welche durch Stimulation der Endothelzellen mit TNFα (5 ng/ml, 4 h) induziert wurden. Vorarbeiten hatten gezeigt, dass TNFα in dieser Konzentration zu einem robusten inflammatorischen Phänotyp in Endothelzellen führt (39).

Die Oberflächenexpression von P-Selectin auf Endothelzellen war unter basalen Kulturbedingungen niedrig und durch Hemmung der SHP-1 nicht signifikant verändert (120 % ± 11 % der Kontrolle, $p = 0,06$, $n = 9-12$). Nach Induktion einer Inflammation durch TNFα führte eine Hemmung der SHP-1 jedoch zu einer signifikant gesteigerten Expression von P-Selectin an der Zelloberfläche (126 % ± 11 % der Kontrolle für TNFα vs. 180 % ± 22 % der Kontrolle für TNFα und SHP-1 Hemmung, $p < 0,05$, $n = 12$, siehe Abbildung 11A).

Des Weiteren wurde die Oberflächenexpression des von Willebrand Faktors (vWF) auf Endothelzellen untersucht, welcher ein weiteres Adhäsionsmolekül darstellt, das in endothelialen Weibel-Palade-Bodies gespeichert wird und unter hohen Scherkräften Thrombozyten-Endothel-Interaktion vermitteln kann. Eine Hemmung der SHP-1 durch Natrium Stibogluconate führte bereits unter basalen Kulturbedingungen zu einer signifikanten Hochregulation des vWF (124 % ± 8 % der Kontrolle, $p < 0,05$, $n = 20$). Im Setting der TNFα-induzierten Inflammation war die Oberflächenexpression von vWF noch höher (121 % ± 8 % der Kontrolle für TNFα und 136 % ± 13 % der Kontrolle nach TNFα und SHP-1 Hemmung, jeweils $p < 0,05$ versus Kontrolle, $n = 9$, siehe Abbildung 11B).

Abbildung 11



Hemmung der SHP-1 verstärkt die TNF α -induzierte Hochregulation von P-Selectin und vWF in primären humanen Endothelzellen (HUVEC). Eine Inflammation wurde durch Stimulation mit TNF α (5 ng/ml für 4 h) simuliert, die Hemmung der SHP-1 erfolgte mit Natrium Stibogluconate (SS, 10 μ g/ml, 30 min vor Versuch). Die Quantifizierung der Oberflächenmoleküle erfolgte mittels Durchflusszytometrie. (A) Oberflächenexpression von P-Selectin. (B) Oberflächenexpression von vWF. * $p < 0,05$, $n = 9-12$ für (A) und $n = 20$ für (B).

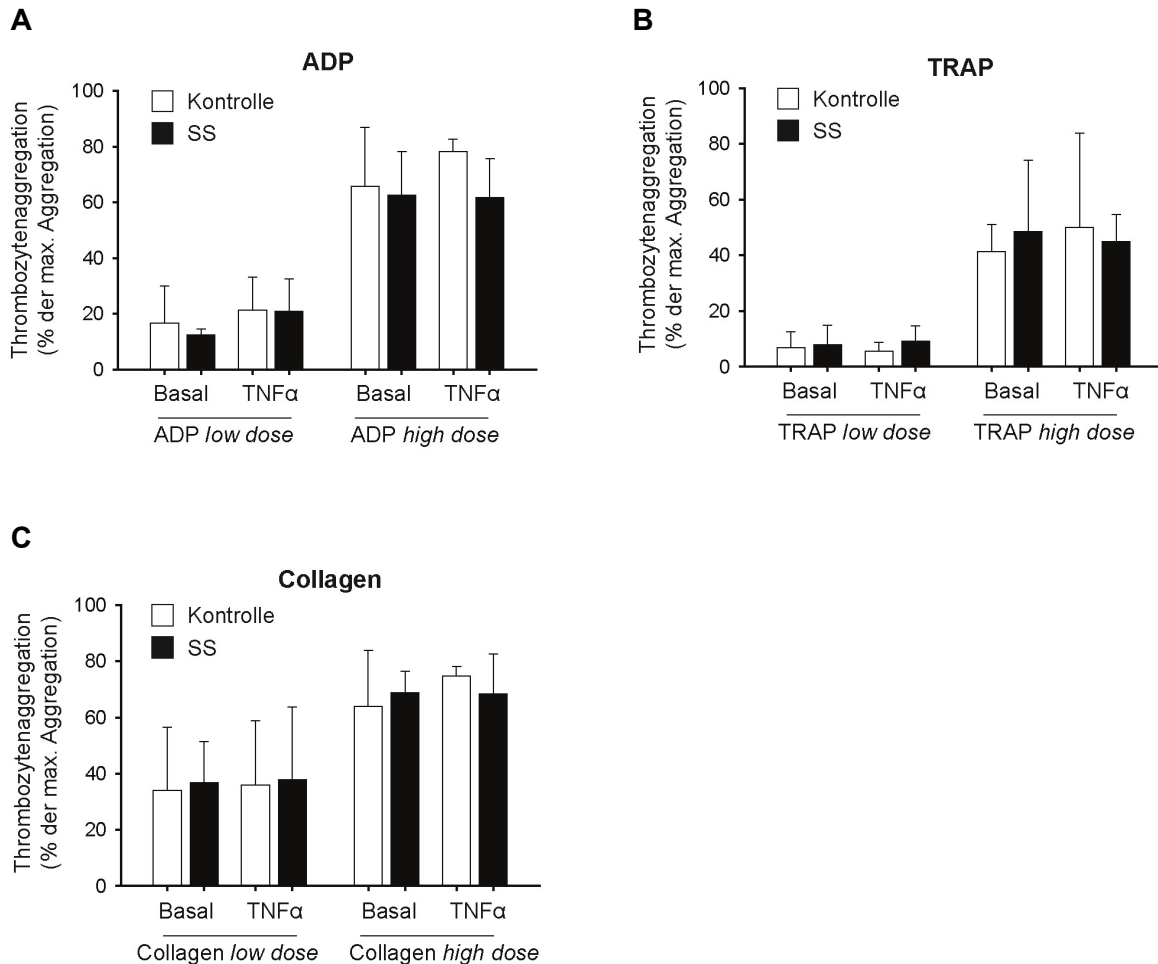
4.6 Einfluss der SHP-1 Hemmung auf die Thrombozytenaggregation

Der direkte Einfluss einer Hemmung der SHP-1 mit Natrium Stibogluconate auf die Thrombozytenfunktion wurde mittels Thrombozytenaggregometrie untersucht. Hierzu erfolgten einerseits Untersuchungen in humanem thrombozytenreichem Plasma (PRP) von gesunden Spendern nach SHP-1 Hemmung *in vitro*, sowie andererseits auch Untersuchungen im Mausblut von Tieren, die vorher systemisch mit dem SHP-1 Hemmer Natrium Stibogluconate behandelt wurden. Analog zu den Experimenten *in vivo* bzw. in kultivierten Endothelzellen erfolgte die SHP-1 Hemmung sowohl unter basalen Bedingungen als auch im Rahmen einer durch TNF α simulierten Inflammation.

4.6.1 Thrombozytenaggregation in humanem *Platelet rich plasma* (PRP)

PRP wurde aus gesunden Spendern gewonnen und *in vitro* mit dem SHP-1 Hemmer Natrium Stibogluconate (30 μ g/ml für 30 Minuten) inkubiert. Ein Teil der Proben wurde zudem 4 h vorher mit TNF α (5 ng/ml) vorbehandelt. Die Thrombozytenaggregation wurde mittels Lichttransmissionsaggregometrie (Born-Methode) nach Stimulation mit den klassischen Thrombozytenagonisten ADP, Collagen und TRAP (*thrombin-receptor activating peptide*), welche jeweils in einer hohen und niedrigen Konzentration eingesetzt wurden, gemessen. Eine SHP-1 Hemmung mit Natrium Stibogluconate hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Thrombozytenaggregation, weder unter basalen Bedingungen noch nach vorheriger Stimulation mit TNF α (n = 9-12, 3-4 verschiedene Spender). Dies zeigte sich für die Induktion der Aggregation sowohl mit niedrigen als auch mit hohen Konzentrationen der verwendeten Thrombozytenagonisten (siehe Abbildung 12).

Abbildung 12

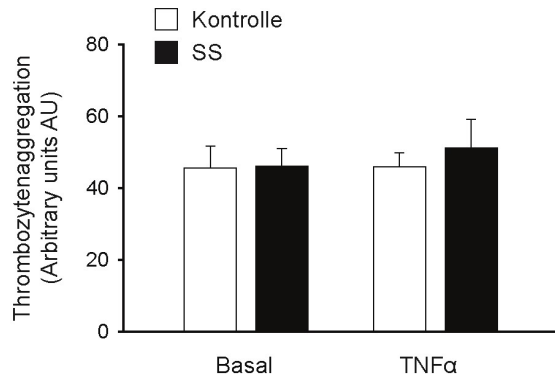


Hemmung der SHP-1 mit Natrium Stibogluconate hat keinen Einfluss auf die Thrombozytenaggregation *in vitro*. Thrombozytenaggregationsversuche wurden in PRP von gesunden Probanden durchgeführt. Die Hemmung der SHP-1 erfolgte mit Natrium Stibogluconate (SS, 10 µg/ml, 30 min vor Versuch), ein Teil der Proben wurde vorher mit TNFα (5 ng/ml für 4 h) behandelt. Die Aggregation wurde durch Zugabe von (A) ADP (*low dose* 0,5-1 µmol/l, *high dose* 10 µmol/l), (B) TRAP (*low dose* 1-1,5 µmol/l, *high dose* 10-15 µmol/l) oder (C) Collagen (*low dose* 0,5-4 µg/ml, *high dose* 10 µg/ml) induziert und für 6 Minuten aufgezeichnet. n = 9-12, 3-4 verschiedene Spender.

4.6.2 Thrombozytenaggregation im Vollblut der Maus

Weiter wurden Thrombozytenaggregationsexperimente auch im Vollblut von Mäusen durchgeführt, die vorher systemisch mit dem SHP-1 Hemmer Natrium Stibogluconate behandelt wurden. In Anlehnung an die in den *in vivo* Versuchen verwendeten Konzentrationen (siehe Kapitel 4.1- 4.3), wo prothrombotische Effekte nach SHP-1 Hemmung in TNF α -induzierter Inflammation beobachtet wurden, erfolgte eine gewichtsadaptierte intravasale TNF α -Applikation so, dass primär eine Konzentration im Blut von 5 ng/ml erreicht wurde. Kontrolltieren wurde das entsprechende Volumen einer Trägerlösung (NaCl) appliziert. Experimente wurden vier Stunden nach Applikation von TNF α durchgeführt. Analog zu den *in vivo* Versuchen erfolgte die Hemmung der Tyrosinphosphatase SHP-1 durch intravasale Applikation von Natrium Stibogluconate 30 Minuten vor Durchführung der Experimente ebenfalls gewichtsadaptiert, sodass primär eine Konzentration im Blut von 10 μ g/ml (11 μ mol/l) erreicht wurde. Nach Blutentnahme aus der inferioren *Vena cava* mit anschließender Euthanasie der Tiere wurde die Thrombozytenaggregation im Vollblut mittels Impedanzaggregometrie am Multiplate Analyzer gemessen. Die Thrombozytenaggregation wurde durch Zugabe von ADP (6,5 μ mol/l) induziert und für 6 Minuten aufgezeichnet. Die systemische Hemmung der SHP-1 mit Natrium Stibogluconate hatte keinen Einfluss auf die Thrombozytenaggregation *ex vivo*, weder unter physiologischen Bedingungen noch nach TNF α -induzierter Inflammation (n = 6 pro Gruppe, siehe Abbildung 13).

Abbildung 13



Hemmung der SHP-1 mit Natrium Stibogluconate hat keinen Einfluss auf die Thrombozytenaggregation im Vollblut *ex vivo*. Die Thrombozytenaggregation wurde mittels Impedanzaggregometrie im Vollblut von Mäusen durchgeführt, die mit dem SHP-1 Hemmer Natrium Stibogluconate (SS, 10 µg/ml, 30 min vor Versuch) behandelt wurden, eine systemische Inflammation wurde durch TNFα (5 ng/ml, 4 h vor Versuch) induziert. Die Thrombozytenaggregation wurde durch Zugabe von ADP (6,5 µmol/l) induziert und für 6 Minuten aufgezeichnet. n = 6 Tiere pro Gruppe.

4.7 Einfluss von TNF α auf SHP-1-Aktivität und -Expression

Als nächstes sollte geklärt werden, welche Mechanismen der durch SHP-1 Hemmung verursachten prothrombotischen Effekte bei TNF α -induzierter Inflammation in Endothelzellen zugrunde liegen. Hierfür wurde der direkte Einfluss von TNF α auf die Phosphatase-Aktivität des Enzyms sowie auf die Expression des Proteins untersucht.

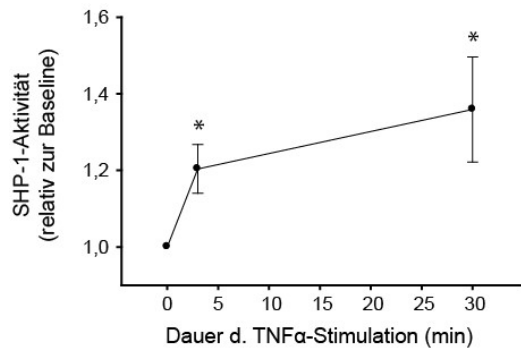
4.7.1 SHP-1-Phosphatase-Aktivität

Der Effekt von TNF α auf die Phosphatase-Aktivität der SHP-1 in Endothelzellen wurde nach Immunpräzipitation des Proteins aus Lysaten von primären Endothelzellen mittels eines photometrischen Phosphatase-Aktivitätsassays (pNPP-Dephosphorylierungsassay) untersucht. Aufgrund der für diesen Assay benötigten großen Mengen an aufgereinigtem Protein wurden bei begrenzter Verfügbarkeit von primären humanen Endothelzellen aus Nabelschnüren (HUVEC) für dieses Experiment primäre Endothelzellen aus Schweineaorten (PAEC) verwendet. Für diese Zellen wurden in Vorversuchen der eigenen Arbeitsgruppe sehr ähnliche Effekte in Bezug auf die Regulation der SHP-1 beobachtet. Die Behandlung von kultivierten Endothelzellen mit TNF α (5 ng/ml) führte zu einer signifikanten Zunahme der SHP-1-Phosphatase-Aktivität bereits wenige Minuten nach Stimulation und stieg nach 30 Minuten noch weiter an (120 % \pm 6 % im Vergleich zur Kontrolle, 3 min nach Stimulation; 136 % \pm 14 % im Vergleich zur Kontrolle, 30 min nach Stimulation, jeweils $p < 0,05$ versus Kontrolle, $n = 6-8$ pro Gruppe, siehe Abbildung 14A).

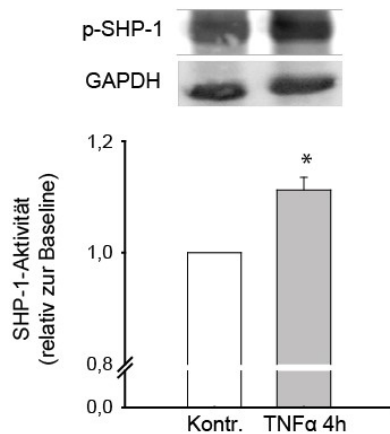
Als nächstes wurde die Phosphorylierung des Tyrosinrests Y564 am SHP-1 Protein mittels *western blot* in primären humanen Endothelzellen (HUVEC) untersucht. Die Expression von GAPDH diene als *loading* Kontrolle. Eine Phosphorylierung der SHP-1 an Y564 korreliert mit der Aktivität des Enzyms (69). Eine Stimulation der Endothelzellen mit TNF α (5 ng/ml, 4 h) führte zu einer signifikant erhöhten Phosphorylierung von Y564 (112 % \pm 2 % der Kontrolle, $p < 0,05$ versus Kontrolle, $n = 4$, siehe Abbildung 14B). Dieses Ergebnis ist kongruent mit den Daten, die mittels photometrischem Phosphatase-Aktivitätsassay in Endothelzellen aus Schweineaorten (PAEC, siehe oben) erhoben wurden.

Abbildung 14

A



B

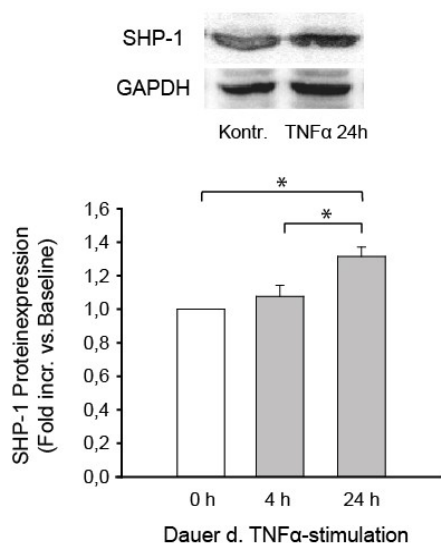


TNFα erhöht die SHP-1-Phosphatase-Aktivität in primären Endothelzellen. Kultivierte primäre Endothelzellen wurden bis zu 4 Stunden mit TNFα (5 ng/ml) behandelt und die SHP-1 Aktivität wurde (A) direkt mittels photometrischem Phosphataseassay nach Immunpräzipitation der SHP-1 in primären Endothelzellen aus Schweineaorten (PAEC) und (B) indirekt über SHP-1-Phosphorylierung an Y564 mittels *western blot* in primären humanen Endothelzellen (HUVEC) bestimmt (repräsentativer *western blot* und densitometrische Auswertung). * $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle, $n = 6-8$ pro Gruppe für A und $n = 4$ pro Gruppe für B.

4.7.2 SHP-1-Proteinexpression

Der Effekt von $\text{TNF}\alpha$ auf die Proteinexpression der SHP-1 in Endothelzellen wurde mittels *western blot* in Volllysaten aus primären humanen Endothelzellen (HUVEC) analysiert. Die Expression von GAPDH diente als *loading* Kontrolle. Die Behandlung von kultivierten Endothelzellen mit $\text{TNF}\alpha$ (5 ng/ml) führte 4 Stunden nach Stimulation, also zu einem Zeitpunkt, wo eine Zunahme der SHP-1-Phosphatase-Aktivität beobachtet worden war (siehe Kapitel 4.7.1), zu keiner signifikanten Zunahme der SHP-1 Proteinexpression ($108 \% \pm 7 \%$ im Vergleich zur Kontrolle, $n = 8$ pro Gruppe). Nach 24 Stunden Stimulation mit $\text{TNF}\alpha$ (5 ng/ml) zeigte sich eine signifikant erhöhte Proteinexpression von SHP-1 im Vergleich zur Kontrolle ($132 \% \pm 6 \%$ im Vergleich zur Kontrolle, $p < 0,05$ versus Kontrolle, $n = 8$ pro Gruppe, siehe Abbildung 15).

Abbildung 15



$\text{TNF}\alpha$ erhöht die SHP-1 Proteinexpression in primären humanen Endothelzellen. Primäre humane Endothelzellen (HUVEC) wurden bis zu 24 Stunden mit $\text{TNF}\alpha$ (5 ng/ml) behandelt und die SHP-1 Proteinexpression wurde mittels *western blot* bestimmt (repräsentativer *western blot* und densitometrische Auswertung). * $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle, $n = 8$ pro Gruppe.

5 DISKUSSION

5.1 Inflammation und atherothrombotische Ereignisse

Die Gruppe der Herz-Kreislaufkrankung bildet nach Angabe des Statistischen Bundesamtes 2015 die häufigste Todesursache in Deutschland. Hierzu gehört insbesondere die koronare Herzerkrankung, welche meist auf dem Boden der Atherosklerose entsteht und in der Manifestation eines akuten Koronarsyndroms einen lebensbedrohlichen Notfall darstellt.

Im Fokus der Forschung zur Pathogenese der Atherosklerose stand sehr lange die sogenannte *Response-to-injury*-Theorie. Sie geht davon aus, dass die bekannten kardiovaskulären Risikofaktoren zu einer Läsion der Intima, welche die innerste Schicht der Gefäßwand bildet, führen können, der eine Ansammlung von Cholesterin (insbesondere LDL-Cholesterin) in der Gefäßwand folgt. Dieses LDL-Cholesterin wird von Makrophagen phagozytiert und im Verlauf werden aus ihnen sogenannte Schaumzellen, die im histologischen Präparat als *fatty streaks* nachzuweisen sind. Dieser Prozess wird von einer Entzündungsreaktion in der Gefäßwand begleitet. Inzwischen wird diesem entzündlichen Aspekt immer größere Bedeutung zugeschrieben und die Atherosklerose sogar als chronisch inflammatorische Krankheit bezeichnet (30). Erkenntnisse aus den letzten 15 Jahren weisen darauf hin, dass proinflammatorische Zytokine wie TNF α oder IL-1 β in der Pathogenese der kardiovaskulären Erkrankungen eine wesentliche Rolle spielen (96-99). Neuere Arbeiten konnten zeigen, dass z. B. TNF α nicht nur eine Rolle in der Pathogenese der Atherosklerose spielt, sondern auch bei akuten arteriellen Gefäßverschlüssen von Bedeutung ist (38, 39). Diese thrombotischen Verschlüsse von Endgefäßen äußern sich nicht selten in Form von fatalen kardiovaskulären Ereignissen, wie dem akuten Myokardinfarkt, ischämischen Schlaganfall oder der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK). Während die direkte Hemmung von Thrombozyten (z. B. durch Aspirin) und die Senkung der Lipidspiegel (z. B. durch Statine), aber auch die Verbesserung der endothelialen Dysfunktion durch die Blockierung von schädlichen Wirkungen von Angiotensin-2 (ACE-Inhibitoren) oder Katecholaminen (Betablocker) feste Säulen in der Therapie von Herz-Kreislauf-Erkrankungen bilden, sind direkte antientzündliche Konzepte bisher noch nicht routinemäßig etabliert.

In dieser Arbeit wurde die Rolle der Tyrosinphosphatase SHP-1 auf Thrombozyten-Endothel-Interaktion und auf die arterielle Thrombose *in vivo* untersucht. In Vorarbeiten der eigenen

Arbeitsgruppe wurde dieses Molekül als wichtiger negativer Regulator der endothelialen Sauerstoffradikalproduktion identifiziert. Da oxidativer Stress auch im Rahmen von inflammatorischen Prozessen von Bedeutung ist, wurde die Rolle der SHP-1 nicht nur unter basalen, physiologischen Bedingungen, sondern insbesondere auch im Rahmen eines TNF α -induzierten inflammatorischen Milieus untersucht.

5.2 Methodische Aspekte und Limitationen

5.2.1 Das Modell der Rückenhautkammer in der Maus

Die *in vivo* Daten dieser Arbeit wurden im Modell der Rückenhautkammer mithilfe der Intravitalmikroskopie in der Maus erhoben. Dies ist ein seit Langem etabliertes Modell zur Untersuchung von mikrozirkulatorischen Prozessen *in vivo* und wurde wesentlich am Institut für Chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilians-Universität München von der Arbeitsgruppe um Endrich entwickelt (100-102). Bereits 1924 machte Sandison mit der Implantation einer transparenten Kammer in das Ohr von Kaninchen, mit der er das Wachstum von Zellen und Gewebe untersuchte, den ersten Schritt Richtung Etablierung dieses Modells (103). Im weiteren Verlauf diente dieses Modell in zahlreichen Studien der Untersuchung von Zell- oder Tumorstadium und der Untersuchung vasoaktiver Substanzen (104-106). Das Rückenhautkammermodell in der Maus ermöglicht einen ungehinderten direkten Blick auf die Mikrozirkulation der Arteriolen und Venolen der Haut. Mithilfe eines modifizierten Mikroskops und einer entsprechend schnell auflösenden Kamera können qualitativ hochwertige intravitalmikroskopische Aufnahmen erstellt werden. Das Rückenhautkammermodell ist auch in anderen Spezies etabliert, wie etwa dem Hamster. Die Maus bietet hierbei jedoch als das am besten untersuchte und häufig eingesetzte präklinische Versuchstier Vorteile. Insbesondere ist die Maus auch für die vorliegende Arbeit und präklinische Untersuchung der SHP-1 geeignet, da zwischen der humanen und der murinen SHP-1 eine Homologie von ca. 95 % besteht (107).

Gegenüber anderen Tiermodellen zur Untersuchung der Mikrozirkulation *in vivo* bietet das Rückenhautkammermodell einige Vorteile, wobei die Untersuchung am wachen Tier vielleicht der entscheidendste Unterschied ist. Während das Cremaster-Modell oder die Mikrozirkulationsuntersuchung im Gefäßbett der A. mesenterica jeweils akute Modelle mit unmittelbar vorangestelltem Trauma im Rahmen der Operation darstellen, fallen diese Störfaktoren, insbesondere der Einfluss der Narkose, im Rückenhautkammermodell weg. Die Präparation der

Hautgefäße erfolgt hier einige Tage vor Versuchsdurchführung, sodass die Akutphase der Entzündung bereits abgeklungen ist. Die Rückenhautkammer ist somit auch für die Untersuchung von länger andauernden bis chronischen Abläufen geeignet. Ein Nachteil des Rückenhautkammermodells im Gegensatz zu Akutmodellen ist sicherlich die schwierigere und aufwändigere Präparation. Weiter muss erwähnt werden, dass in diesem Modell Prozesse in der Mikrozirkulation untersucht werden, wobei sich gerade klinisch relevante atherothrombotische Prozesse vor allem in größeren Blutgefäßen manifestieren. Diesbezüglich müssen Erkenntnisse aus der Mikrozirkulation sicherlich sorgfältig auf andere Gefäßbetten übertragen werden. Allerdings wurde das Rückenhautkammermodell schon erfolgreich für ähnliche Studien angewendet (6, 108, 109), wobei die Ergebnisse gut mit der Pathophysiologie und klinischen Beobachtungen in größeren Gefäßen korrelierten (8, 110). Die Untersuchung im Mikrozirkulationsmodell hat wiederum den Vorteil, dass selektive Prozesse wie Einzelzell-Interaktionen intravitalmikroskopisch in einer sehr hohen Qualität beobachtet und analysiert werden können. Aufgrund oben genannter Vorteile und nicht zuletzt aufgrund der guten Vorerfahrungen mit diesem Modell in der eigenen Arbeitsgruppe wurden die *in vivo* Experimente in dieser Arbeit im Rückenhautkammermodell in der Maus durchgeführt.

5.2.2 Analyse der Thrombozyten-Endothel-Interaktion *in vivo*

Thrombozyten-Endothel-Interaktionen spielen nicht nur in akuten atherothrombotischen Ereignissen, sondern auch in der Pathogenese von atherosklerotischen Läsionen einen Rolle (111, 112). Der direkte Blick auf die Mikrozirkulation in der Rückenhautkammer ermöglicht zusammen mit dem verwendeten System der Intravitalmikroskopie qualitativ hochwertige Aufnahmen der Vorgänge an der Gefäßwand. Mit dieser Methodik wurden die direkten Interaktionen intakter Endothelzellen mit isolierten und *ex vivo* gefärbten Thrombozyten eines Spendertieres untersucht. Diese Kontakte werden einerseits durch den Aktivierungsgrad der Thrombozyten und andererseits durch die Endothelfunktion beeinflusst, wobei eine vermehrte Thrombozyten-Endothel-Interaktion Hinweis für eine endotheliale Dysfunktion mit verminderter Bildung antithrombotischer Substanzen sein kann. Im Rahmen der Isolierung und Färbung der Thrombozyten kann eine geringe Voraktivierung nicht ganz ausgeschlossen werden, sie kann jedoch durch etablierte Protokolle standardisiert und sehr gering gehalten werden. Im Vergleich mit der Methodik der intravitalen Thrombozytenfärbung, z. B. durch Antikörper, ist die *ex vivo* Färbung mit Carboxyfluorescein wesentlich stärker und ermöglicht so die Visualisierung einzelner Thrombozyten. In dieser Arbeit wurden für die Untersuchung der Thrombozyten-Endothel-

DISKUSSION

Interaktion unbehandelte Thrombozyten aus Spendertieren Empfängertieren, die mit $\text{TNF}\alpha$ bzw. Natrium Stibogluconate behandelt wurden, transfundiert. Dieses Setting, in dem auch nur die markierten, transfundierten (also unbehandelten) Thrombozyten ausgewertet wurden, zeigt also vor allem Unterschiede in der Endothelfunktion und weniger Unterschiede in den Thrombozyten auf.

Trotz qualitativ hochwertiger Videoaufnahmen bleibt insbesondere die transiente Interaktion von Thrombozyten mit der Gefäßwand vor allem aufgrund ihrer kurzen Dauer nach wie vor eine Herausforderung. In dieser Arbeit wurde der Annahme gefolgt, dass eine niedrigere Fließgeschwindigkeit eine vermehrte Interaktion mit der Gefäßwand repräsentiert. Das Verteilungsmuster der Fließgeschwindigkeiten der einzelnen Thrombozyten gibt schließlich Auskunft über das Ausmaß der Thrombozyten-Endothel-Interaktion in einem bestimmten, abgrenzbaren Gefäßabschnitt der untersuchten Arteriole. Zusätzlich wurden diejenigen Thrombozyten analysiert, die besonders langsam waren und als rollende Thrombozyten relevant mit der Gefäßwand interagieren. Als rollende Thrombozyten wurden alle Thrombozyten mit einer Fließgeschwindigkeit von weniger als 5 % des im selben Gefäßabschnitt gemessenen schnellsten Thrombozyten (als Maß für die Blutflussgeschwindigkeit in dem jeweiligen Gefäßabschnitt) definiert.

5.2.3 Gefäßverletzung durch Fe_3Cl_2 als Thrombosemodell in der Maus

In der Literatur sind verschiedene Thrombosemodelle in der Maus beschrieben, die zum Teil in unterschiedlichen Gefäßbetten Anwendung finden. Dabei liegen mechanistisch etwa eine chemische Gefäßverletzung, eine photochemisch induzierte Oxidationsverletzung (Licht-Farbstoff-Technik) (113, 114), eine direkte Laserverletzung, eine vorübergehende Ligatur des Gefäßes, oder auch intraluminale mechanische oder elektrische Verletzungen zu Grunde (115). Einige dieser Methoden sind in ihrer Anwendung technisch schwierig und wenig praktikabel, wie z. B. die Ligatur kleiner Arteriolen oder Venolen in der Mikrozirkulation der Maus. Die direkte Verletzung von Blutgefäßen mit Fe_3Cl_2 ist eine seit Langem gut etablierte Technik, um *in vivo* die schnelle Bildung eines Thrombus zu induzieren, und diente aufgrund ihrer guten Reproduzierbarkeit bereits in zahlreichen Studien der Untersuchung von Thromboseentstehung (116, 117). Dieses Modell wurde auch in Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe erfolgreich angewendet (108, 109). Während dieses Modell zuverlässig eine sehr lokalisierte Gefäßschädigung zulässt, besteht ein Nachteil darin, dass die Superfusion von außen keine selektive Verletzung des Endothels zulässt, d. h. alle

DISKUSSION

Zellen der Gefäßwand werden geschädigt. In dieser Arbeit erfolgte vor der direkten topischen Applikation von Fe_3Cl_2 auf Arteriolen der Rückenhautkammer die systemische Gabe des Fluoreszenzfarbstoffes FITC-Dextran. Hiermit wurde das Plasma angefärbt, sodass die sukzessive Formation eines Thrombus durch die Zunahme des negativen Kontrastes im Gefäß genau beobachtet werden konnte. Der hier untersuchte Endpunkt war der okkludierende Gefäßverschluss, definiert durch eine komplette Stase des Blutflusses.

Bei der oben beschriebenen arteriolen Thrombusbildung spielen sowohl endotheliale Faktoren als auch Blutzellen und insbesondere Thrombozyten eine Rolle. Im Gegensatz zum davor diskutierten Modell der Thrombozyten-Endothel-Interaktion (siehe Kapitel 5.2.3) findet hier der Kontakt von Thrombozyten mit dem Endothel jedoch nicht ausschließlich mit intakten Zellen, sondern auch mit mechanisch durch Fe_3Cl_2 geschädigten Endothelzellen statt. Außerdem kommen die Blutzellen auch mit subendothelialen Strukturen in Verbindung. Letztlich spielen aber auch hier entzündliche Faktoren und insbesondere reaktive Sauerstoffspezies (ROS) eine Rolle, zumal auch die Verletzung mit Fe_3Cl_2 einen oxidativen Schaden darstellt. Nach Gefäßverletzung kommt es zunächst zur Exposition endothelialer und subendothelialer Adhäsionsmoleküle wie vWF bzw. Collagen, an welche Thrombozyten adhären und in der Folge aktiviert werden können. Nach auto- und parakriner Aktivierung kommt es zur Rekrutierung weiterer Thrombozyten und schließlich zur Aggregation mit okkludierendem Verschluss des Gefäßes (118, 119). Während die transiente Thrombozyten-Endothel-Interaktion pathophysiologisch zur vaskulären Entzündung beiträgt, beleuchtet das Modell der arteriolen Thrombusbildung Mechanismen, die im akuten kardiovaskulären Ereignis stattfinden.

5.2.4 Methoden zur Messung der Thrombozytenaggregation

Zur Messung der Thrombozytenaggregation *in vitro* stehen verschiedene Methoden zur Verfügung, welche für unterschiedliche Anwendungen unterschiedlich gut geeignet sind. In dieser Arbeit kamen einerseits die Lichttransmissionsaggregometrie nach Born und andererseits die Impedanzaggregometrie mittels Multiplate-Analyzer zur Anwendung. Ihre Vor- und Nachteile sollen an dieser Stelle kurz diskutiert werden.

Zur Analyse möglicher Effekte von Natrium Stibogluconate auf humane Thrombozyten wurde die Messung der Thrombozytenaggregation mittels Lichttransmissionsaggregometrie in thrombozytenreichem Plasma verwendet. Dieses Verfahren stellt nach wie vor den Goldstandard

DISKUSSION

dar, denn es ermöglicht die isolierte Untersuchung einer Substanz bzw. ihrer Wirkung auf Thrombozyten. Mögliche Einflüsse durch andere Blutzellen wie Leukozyten oder Erythrozyten werden dabei ausgeschlossen. Die Thrombozytenaggregation im Vollblut der Maus nach systemischer Behandlung mit Natrium Stibogluconate wurde mittels Impedanzaggregometrie gemessen. Analog zur Lichttransmissionsaggregometrie erfolgt hierbei die Induktion der Thrombozytenaggregation durch Zugabe eines Thrombozytenagonisten (ADP, TRAP, Collagen). Bei dieser Messung im Vollblut können auch mögliche Einflüsse anderer Blutzellen zum Tragen kommen. Die Impedanzaggregometrie bietet den Vorteil einer extrem einfachen Probenaufbereitung ohne vorherige Zentrifugationsschritte und damit zusammenhängender möglicher Störfaktoren. Gerade für *ex vivo* Messungen von *in vivo* applizierten Substanzen eignet sich diese Methode hervorragend, da eine ungewollte Beeinflussung durch die Probenbearbeitung und post-experimentelle Einflüsse auf mögliche Effekte reduziert werden. Deswegen stellt die Impedanzaggregometrie im Vollblut auch in der klinischen Routine ein etabliertes Verfahren dar, um etwa das Ansprechen auf thrombozytenhemmende Medikamente wie z. B. ADP-Rezeptor-Antagonisten (Clopidogrel, Prasugrel, Ticagrelor) zu untersuchen.

5.2.5 Natrium Stibogluconate als spezifischer Inhibitor der SHP-1

In dieser Studie wurde Natrium Stibogluconate als Inhibitor der Tyrosinphosphatase SHP-1 verwendet. Es handelt sich dabei um ein Medikament, welches bereits im 2. Weltkrieg zur Behandlung der Leishmaniose eingesetzt wurde. Pathak et al. haben gezeigt, dass Natrium Stibogluconate ein potenter Inhibitor von Phosphatasen und insbesondere auch der SHP-1 ist. Dabei wurde die SHP-1-Phosphatase-Aktivität *in vitro* von Natrium Stibogluconate in einer Dosierung von 10 µg/ml nahezu vollständig gehemmt, während andere Phosphatasen wie die SHP-2 oder PTP1B zu einem weitaus geringeren Anteil beeinflusst und erst in höheren Dosierungen gehemmt wurden (83). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Natrium Stibogluconate in einer Dosis von 10 µg/ml zu einer deutlichen Reduktion der SHP-1-Aktivität in kultivierten humanen Endothelzellen *in vitro* führt. In Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe konnten SHP-1-vermittelte Effekte mit Natrium Stibogluconate gehemmt werden (90). Deswegen wurde in dieser Arbeit für Natrium Stibogluconate eine Dosierung von 10 µg/ml für die *in vitro* als auch für die *in vivo* Versuche verwendet. Diese Dosis wurde in etwa auch im Serum von mit Natrium Stibogluconate behandelten Leishmaniose-Patienten gemessen (120).

5.3 Rolle der SHP-1 in TNF α -induzierter Entzündung

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass eine Hemmung der Tyrosinphosphatase SHP-1 mit Natrium Stibogluconate in einer vermehrten Thrombozyten-Endothel-Interaktion und einer beschleunigten arteriolen Thrombusbildung *in vivo* einhergeht. Diese Effekte werden im Milieu einer TNF α -induzierten Inflammation weiter verstärkt. Im Folgenden sollen die zugrunde liegenden Mechanismen diskutiert werden.

5.3.1 Hemmung der SHP-1 bewirkt prothrombotische Effekte *in vivo*

In den *in vivo* Experimenten wurden Thrombozyten gesunder Spendertiere isoliert, angefärbt und den Versuchstieren über einen zentralen Zugang appliziert. Den Versuchstieren wurde bereits 48 Stunden vorher die Rückenhautkammer implantiert, sodass die Analyse der Thrombozyten-Endothel-Interaktion in einem stabilen, d. h. nicht akut inflammatorischen Setting durchgeführt werden konnte. Eine Behandlung der Versuchstiere mit dem SHP-1-Inhibitor Natrium Stibogluconate führte in diesem „physiologischen“ Setting zu keinem signifikanten Anstieg rollender Thrombozyten im Vergleich zu Sham-behandelten Kontrolltieren. In einem akut inflammatorischen Setting, welches durch die Behandlung der Tiere mit TNF α simuliert wurde, führte die Hemmung der SHP-1 zu einer signifikant erhöhten transienten Thrombozyten-Endothel-Interaktion, welche durch Quantifizierung der Thrombozyten wie oben beschrieben analysiert wurde. Wenn das Endothel aktiviert wird, können Thrombozyten – ähnlich wie Leukozyten – am Endothel entlang rollen und über diverse Adhäsionsmoleküle direkt mit dem Endothel interagieren und kommunizieren (121). Bei hohen Scherkräften (*shear stress*) vermitteln GPIIb und P-Selectin mit ihren Rezeptoren PSGL-1 bzw. vWF die Interaktion von Thrombozyten mit dem Endothel und triggern die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und Chemokine wie P-Selectin, IL1- β und CD40L, die in den thrombozytären α -Granula gespeichert werden und ihrerseits wiederum das Endothel aktivieren (122). *In vitro* führte die Hemmung der SHP-1 mit Natrium Stibogluconate in kultivierten Endothelzellen zu einer raschen Hochregulation von P-Selectin im Setting der TNF α -induzierten Inflammation. Eine signifikante Hochregulation von vWF durch SHP-1-Hemmung konnte bereits unter Basalbedingungen beobachtet werden, was gut zu den *in vivo* Ergebnissen passt. Eine Hochregulation dieser Adhäsionsmoleküle kann durch ROS vermittelt werden, einerseits über Redox-sensitive Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B (123), andererseits auch durch eine schnelle Freisetzung aus den Weibel-Palade-Bodys durch posttranslationale Signalwege über die klassische NADPH-Oxidase und auch die Xanthin-Oxidase (124). Vorarbeiten aus der eigenen

DISKUSSION

Arbeitsgruppe beschreiben die SHP-1 als negativen Regulator der endothelialen NADPH-Oxidase-abhängigen Superoxid-Produktion unter physiologischen Bedingungen (125). Eine Beteiligung von ROS an der beobachteten Hochregulation von Adhäsionsmolekülen ist somit naheliegend.

In einem weiteren Versuch wurde die arterioläre Thrombusbildung nach Gefäßverletzung durch Fe_3Cl_2 untersucht. In diesem Versuch führte die Hemmung der SHP-1 bereits unter basalen Bedingungen (d. h. ohne vorherige Stimulation mit $\text{TNF}\alpha$) zu einem signifikant beschleunigten thrombotischen Gefäßverschluss in den Arteriolen der Rückenhaut. Dieser Effekt war in $\text{TNF}\alpha$ -induzierter Inflammation noch ausgeprägter. Es konnte gezeigt werden, dass $\text{TNF}\alpha$ arterioläre Thrombusbildung *in vivo* verstärken kann (38, 39). Dies kann durch verschiedene Mechanismen auf Transkriptionsebene erklärt werden, unter anderem durch Hochregulation prothrombotischer Moleküle wie *tissue factor* und PAI-1, aber auch durch Herabregulation von antithrombotisch wirkendem Thrombomodulin (39). Zudem konnte gezeigt werden, dass die Oberflächenexpression von vWF auf Endothelzellen zu mikrovaskulärer Thrombose beitragen kann (126), und auch oxidativer Stress kann prothrombotische Veränderungen induzieren (123). Passend hierzu verstärkte die Hemmung der SHP-1-Aktivität die $\text{TNF}\alpha$ -induzierte Hochregulation von P-Selectin und vWF in kultivierten Endothelzellen *in vitro*. Die Tatsache, dass diese Effekte bereits nach kurzer Zeit beobachtet werden können, ist ein weiter Hinweis darauf, dass eine gesteigerte ROS-Produktion mitverantwortlich für die Steigerung der $\text{TNF}\alpha$ -induzierten prothrombotischen Effekte sein könnte.

5.3.2 Welche Rolle spielen dabei direkte Effekte auf Thrombozyten?

Im Rahmen dieser Arbeit wurde insbesondere die Rolle der endothelialen SHP-1 untersucht. Ausgehend von den Beobachtungen einer verstärkten arteriolären Thrombusbildung nach SHP-1-Hemmung *in vivo* können jedoch direkte Effekte des eingesetzten Hemmstoffes Natrium Stibogluconate auf andere Zellen und insbesondere Thrombozyten nicht ausgeschlossen werden. Mögliche Effekte auf Thrombozyten sollten insofern in Betracht gezogen werden, da diverse Studien eine Expression von Tyrosinphosphatasen in Zellen des hämatopoetischen Systems inklusive Thrombozyten gezeigt haben.

Der thrombozytäre Immunrezeptor PIRB (*murine paired immunoglobulin-like receptor B*) beinhaltet mehrere ITIM-Sequenzen und rekrutiert und aktiviert Phosphatasen wie die SHP-1 und SHP-2. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass eine Deletion von PIRB die

DISKUSSION

Thrombozytenaggregation fördert (127). Dies scheint jedoch eher über eine Verstärkung der SHP-2-Phosphataseaktivität vermittelt zu werden als über Effekte der SHP-1. SHP-1 ist außerdem ein Substrat des Adhäsionsmoleküls PECAM-1 und seiner ITIM-Sequenz (128). Unter Aktivierung von PECAM-1 sinkt der Gesamtlevel von tyrosinphosphorylierten Proteinen in Thrombozyten, und interessanterweise wird die Collagen-induzierte Thrombozytenaggregation und die Thrombozytensekretion dabei reduziert (129). Ein direkter inhibitorischer Effekt der SHP-1 und SHP-2 wurde für die LDL-induzierte Thrombozytenaggregation beschrieben (80). Isolierte Thrombozyten aus *me^v/me^v* Mäusen (Mäuse mit einem Defekt im SHP-1-Gen, siehe Kapitel 1.5.1) hatten eine verminderte Aktivierung nach Stimulation mit Agonisten des GPVI-Rezeptors wie z. B. Collagen gezeigt, was eine physiologische Rolle der SHP-1 in der Regulation der Aktivierungsschwelle des GPVI-Rezeptors nahelegt (81). Außerdem wurde eine Rolle der SHP-1 in der Regulation der thrombozytären eNOS beschrieben (130). Eine weitere Studie konnte zeigen, dass die SHP-1 über eine Komplexbildung mit Spinophilin dazu beiträgt, Thrombozyten unter basalen Bedingungen in einem inaktivierten Zustand zu halten (131).

Um zu klären, ob an den in dieser Arbeit *in vivo* beobachteten prothrombotischen Effekte direkte Einflüsse einer SHP-1 Hemmung mit Natrium Stibogluconate auf Thrombozyten beteiligt sind, wurden Thrombozytenaggregationsstudien *in vitro* an humanem PRP sowie *ex vivo* in Mausblut durchgeführt. Hierbei wurden Konzentrationen von Natrium Stibogluconate verwendet, die beachtliche Effekte in Endothelzellen erzielt hatten. Hervorzuheben ist, dass bei einer SHP-1 Hemmung mit Natrium Stibogluconate keine Effekte auf die Thrombozytenaggregation in humanem PRP *in vitro* nach Stimulation mit klassischen Thrombozyten-aktivierenden Substanzen wie Collagen, TRAP oder ADP beobachtet werden konnten. Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich auch nach vorheriger Inkubation mit TNF α , was in Endothelzellen die Wirkung der SHP-1 Hemmung deutlich verstärkt hatte. Ebenso war die Thrombozytenaggregation *ex vivo* in murinem Vollblut nach Behandlung mit Natrium Stibogluconate nicht verändert im Vergleich zu Kontrolltieren, sowohl unter basalen Bedingungen als auch in TNF α -induzierter Inflammation. In Zusammenschau der Ergebnisse liegt der Schluss nahe, dass die prothrombotischen Effekte der SHP-1 Hemmung, die in den *in vivo* Experimenten beobachtet wurden, eher auf endotheliale Effekte als auf direkte thrombozytäre Effekte zurückzuführen sind.

5.4 Rolle der SHP-1 im TNF α -Signalweg

In weiteren Untersuchungen wurde der Mechanismus der durch SHP-1 Hemmung verstärkten Effekte von TNF α untersucht. Hierbei stellte sich insbesondere die Frage, ob es sich um rein additive Effekte handelt, oder aber ob die Aktivität der Tyrosinphosphatase möglicherweise durch TNF α mitreguliert oder moduliert wird, bzw. ob umgekehrt die SHP-1-Phosphatase-Aktivität Signalwege im TNF α -Signalweg beeinflusst. Um diese Fragestellungen zu untersuchen, kam ein sehr sensibler Phosphatase-Aktivitäts-Assay zur Anwendung. Hierbei wurde PNPP als Substrat verwendet, bei dem die Abspaltung eines Phosphatrestes zu einem Farbumschlag führt, der photometrisch erfasst werden kann. Um spezifisch die SHP-1-Aktivität zu erfassen, wurde das Protein mittels Immunpräzipitation aufgereinigt. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine erhöhte SHP-1-Phosphataseaktivität in kultivierten Endothelzellen bereits wenige Minuten nach Stimulation mit TNF α , die sich auch nach vier Stunden in Form einer erhöhten Phosphorylierung des Tyrosin-Restes Y564 zeigt, was wie in der Einleitung beschrieben mit einer erhöhten Phosphataseaktivität einhergeht. Nachdem die Hemmung der SHP-1 zu prothrombotischen Veränderungen führte, die besonders ausgeprägt in TNF α -induzierter Inflammation waren, lässt eine TNF α -induzierte Phosphataseaktivierung vermuten, dass die SHP-1 eine wichtige autoinhibitorische Rolle im akuten TNF α -*Signalling* spielt. Bemerkenswerterweise waren die absoluten SHP-1-Proteinlevel in Endothelzellen innerhalb der ersten Stunden nach TNF α -Stimulation nicht signifikant erhöht. Insgesamt könnte die Tyrosinphosphatase SHP-1 also im TNF α -Signalweg einen autoinhibitorischen Feedbackmechanismus darstellen, der überschießende Entzündungsantworten und deren Folgen wie auch Thrombusbildung verhindern soll.

Autoinhibitorische Funktionen der SHP-1 wurden bereits für andere Zelltypen wie Lymphozyten, Makrophagen und Thrombozyten beschrieben, in denen die Phosphatase co-aktiviert wird und als negativer Regulator im Immunrezeptor-Signalweg dient (81, 132, 133). In diesem Sinne haben auch die eigenen Vorarbeiten der Arbeitsgruppe gezeigt, dass eine Hemmung der SHP-1 in Endothelzellen zu einer erhöhten VEGF-abhängigen Superoxidbildung führt (90). In bovinen aortalen Endothelzellen konnte ebenfalls eine Aktivierung der SHP-1 durch TNF α gezeigt werden mit der Folge einer verminderten Wachstumsfaktor-vermittelten Zellproliferation (134). Eine andere Gruppe konnte zeigen, dass TNF α möglicherweise über die SHP-1 angiogene Prozesse moduliert, nachdem die Hemmung der SHP-1 das endotheliale Zellwachstum förderte. Bemerkenswerterweise waren diese Effekte auf eine reduzierte Fähigkeit von TNF α , die

DISKUSSION

Tyrosinphosphorylierung von VEGFR2 durch VEGF zu blockieren, zurückzuführen (135). Insgesamt gibt es also starke Hinweis für eine negative Feedbackregulation der SHP-1 im TNF α -Signalweg. Verschiedene Proteine werden nach Aktivierung der TNF-Rezeptor-Signalwege Tyrosin-phosphoryliert, unter ihnen befinden sich Kinasen der src- und jak-Familie, für welche zumindest teilweise eine Regulation durch SHP-1 beschrieben wurde (136, 137). Interessanterweise liegen die Genloci der SHP-1 und des TNFR-2 so nah zusammen, dass die Rekombination beider Gene nur 0,7 Centimorgan beträgt (138) Ob diese Tatsache mit der funktionellen Verbindung von SHP-1-Aktivität und TNF α -Signalwegen zusammenhängt, bleibt spekulativ und muss durch weitere Untersuchungen geklärt werden.

Während sich die absoluten Proteinlevel der SHP-1 in Endothelzellen (im Gegensatz zur Phosphatase-Aktivität) innerhalb der ersten Stunden nach TNF α -Stimulation nicht signifikant unterschieden, zeigte sich 24 Stunden nach TNF α -Stimulation auch ein Anstieg der absoluten SHP-1-Proteinlevel. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass sich die Funktion der SHP-1 nicht auf akut entzündliche Prozesse beschränkt, sondern auch in chronisch entzündlichen Prozessen von Bedeutung ist, und somit auch von Relevanz für die Pathogenese der Atherosklerose sein könnte.

5.5 Klinische Relevanz

Angesichts der entscheidenden Rolle von inflammatorischen Zytokinen und reaktiven Sauerstoffspezies in der Pathophysiologie der kardiovaskulären Erkrankungen stellen solche Moleküle ein interessantes Ziel für pharmakologische Ansätze dar. Es wurden bereits zahlreiche Studien durchgeführt, die sowohl Antikörper gegen verschiedene inflammatorische Zytokine als auch Antioxidantien auf ihre möglichen positiven Wirkungen hin untersucht haben. Leider waren die Ergebnisse aus diesen Studien hinsichtlich eines klinischen Benefits bisher nicht eindeutig, so dass diese Ansätze bislang auch keinen Einzug in die Standardtherapie der kardiovaskulären Ereignisse gefunden haben (139-142). Umso wichtiger ist es, weitere Kenntnisse über das Immunsystem und seine Signalwege zu gewinnen, neue pharmaklogische Therapieansätze zu verfolgen und die translationale Forschung zu forcieren. Ein limitierender Faktor für anti-inflammatorische Therapien ist sicher die Tatsache, dass sowohl unser angeborenes als auch unser erworbenes Immunsystem äußerst komplex funktionieren. Inflammatorische Zytokine oder Entzündungsmediatoren haben wichtige protektive Funktionen in der Infektabwehr und üben räumlich und zeitlich (z. B. in Abhängigkeit vom umliegenden Gewebe) sehr differenzierte Funktionen aus, sodass sich ein schmaler Grat zwischen Nutzen und Nebenwirkungen ergibt. Dies

DISKUSSION

zeigen auch Daten über nichtsteroidale Antiphlogistika (NSAID), deren Einsatz teilweise mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko assoziiert wurde (143, 144). Wie aktuell die Thematik der antiinflammatorischen Therapie in kardiovaskulären Erkrankungen aber weiterhin ist, beweist eine aktuelle Studie, in der die Anwendung des anti-IL-1 β -Antikörper Canakinumab in Patienten nach akutem Myokardinfarkt unabhängig von anderen Risikofaktoren das Auftreten von erneuten kardiovaskulären Ereignissen signifikant reduzieren konnte (145). Diese Studie bestätigt fast 20 Jahre nach dem Aufkommen der Inflammationshypothese zur Pathogenese atherosklerotischer Erkrankungen dieses Erklärungsmodell.

Tyrosinkinaseinhibitoren wie Imatinib (Erstzulassung 2001) haben in der Standardtherapie verschiedener Malignome und insbesondere der Chronisch Myeloischen Leukämie (CML) bereits einen wichtigen Platz eingenommen und Erfolgsgeschichte geschrieben. Die Beeinflussung von Tyrosinphosphatasen ist in ihrer klinischen Anwendung noch nicht so weit vorangeschritten, wobei es auch erste Daten zur möglichen Rolle der SHP-1 als therapeutische Zielstruktur gibt. Eine Hemmung der SHP-1 konnte in tierexperimentellen Studien die Infarktgröße bei Myokardinfarkt oder Apoplex reduzieren (79, 146, 147). Dies kann als vielversprechender Ansatz verstanden werden, da in der Therapie der Leishmaniose mit dem Wirkstoff Natrium Stibogluconate bereits ein wirksamer Hemmer der SHP-1 zugelassen ist. Die Hemmung einer anderen Tyrosinphosphatase, der PTP1B, führte zur Verbesserung der peripheren endothelialen Dysfunktion bei Herzinsuffizienz (148). Trotz einiger interessanter Voruntersuchungen bedarf die Beeinflussung der Tyrosinphosphorylierung als therapeutisches Prinzip in der kardiovaskulären Medizin, insbesondere die Verwendung von Tyrosinphosphataseinhibitoren, aber noch umfangreicher weiterer Studien. Insbesondere ist hierzu ein besseres Verständnis der vielen verschiedenen zytosolischen und membran-gebundenen Tyrosinphosphatasen notwendig, deren zelluläre Effekte und Funktionen sehr vielfältig und teilweise auch antagonistisch sind.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Herz-Kreislauf-Erkrankungen gehören weiterhin zu den häufigsten Todesursachen in den westlichen Industrienationen. Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass inflammatorische Prozesse einen entscheidenden Faktor in der Pathophysiologie der kardiovaskulären Erkrankungen darstellen. TNF α gilt als eines der wichtigsten Zytokine, die bei Inflammation vermehrt vorliegen. Es konnte mehrfach gezeigt werden, dass gesteigerte TNF α -Plasmaspiegel und damit einhergehende erhöhte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies mit einem erhöhten Risiko für das Auftreten atherothrombotischer Ereignisse wie Myokardinfarkt oder Schlaganfall korrelieren.

SHP-1 ist eine Tyrosinphosphatase, die vor allem aus dem hämatopoetischen System bekannt ist, wo sie in Zellen des Immunsystems über sogenannte ITIMs (*immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs*) aktiviert werden kann und inhibitorische Funktionen ausübt. Es gibt zudem Hinweise, dass die SHP-1 auch inflammatorische Prozesse hemmen kann. In genetisch veränderten Mäusen mit einem Funktionsdefekt dieser Phosphatase (*me^v/me^v* Mäuse) liegen etwa erhöhte TNF α -Spiegel vor. In Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die SHP-1 auch in Endothelzellen exprimiert wird und dort über eine Beeinflussung der PI3-Kinase die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies vermindert.

Diese Arbeit befasste sich mit der Fragestellung, inwiefern die endotheliale SHP-1 eine Rolle für die Thrombozyten-Endothel-Interaktion und arterielle Thrombusbildung *in vivo* spielt. Hierfür wurden *in vivo* Versuche im Rückenhautkammermodell der Maus durchgeführt, einem Modell zur intravitalmikroskopischen Analyse der Mikrozirkulation. Die zugrundeliegenden Mechanismen wurden weiter *in vitro* an primären humanen Endothelzellen (HUVEC) sowie an isolierten humanen Thrombozyten untersucht. Die Tyrosinphosphatase SHP-1 wurde pharmakologisch mit Natrium Stibogluconate gehemmt. Diese Substanz wird klinisch in der Behandlung der Leishmaniose eingesetzt und es wurde gezeigt, dass sie in niedrigen Konzentrationen durch ihre hohe Affinität zur SHP-1 sehr selektiv diese Tyrosinphosphatase hemmt.

Eine systemische Hemmung der SHP-1 durch Natrium Stibogluconate führte in Mäusen unter physiologischen Bedingungen zu keiner signifikant verstärkten Thrombozyten-Endothel-Interaktion *in vivo* in Arteriolen der Rückenhaut. Nach vorheriger Induktion einer systemischen Inflammation durch TNF α führte die Hemmung der SHP-1 jedoch zu einem vermehrten Anteil von

ZUSAMMENFASSUNG

am Endothel „rollenden“ Thrombozyten, was mittels intravitalmikroskopischer Analyse erfasst wurde. In einem Modell der arteriolen Thrombusbildung nach Gefäßverletzung mit Fe_3Cl_2 führte die Hemmung der SHP-1 zu einer beschleunigten Thrombusbildung mit thrombotischem Verschluss des Gefäßes. Dieser Effekt war im Setting einer $\text{TNF}\alpha$ -induzierten Inflammation weiter verstärkt. Interessanterweise wurde die Thrombozytenfunktion durch Natrium Stibogluconate nicht beeinflusst. Die ADP-induzierte Thrombozytenaggregation war im Vollblut von Mäusen, welche mit Natrium Stibogluconate behandelt wurden, nicht verändert, weder im physiologischen Setting noch im Rahmen der $\text{TNF}\alpha$ -induzierten Inflammation. Auch in der Thrombozytenaggregation in humanem PRP aus gesunden Spendern hatte die gezielte Hemmung der SHP-1 mit Natrium Stibogluconate keinen Einfluss auf die durch klassische Thrombozytenaktivatoren wie ADP, TRAP (*thrombin-receptor activating peptide*) oder Collagen ausgelöste Thrombozytenaggregation.

In vitro führte die Hemmung der SHP-1 in primären humanen Endothelzellen (HUVEC) zu einer Hochregulation der für Thrombozyten-Endothel-Interaktion und arterielle Thrombose bedeutenden Adhäsionsmoleküle P-Selectin und vWF, was mittels Durchflusszytometrie gemessen wurde. Diese Effekte zeigten sich bereits unter basalen Kulturbedingungen, vermehrt jedoch nach vorheriger Induktion eines proinflammatorischen Phänotyps durch $\text{TNF}\alpha$. Durch gezielte Messung der SHP-1-Phosphatase-Aktivität in einem photometrischen Phosphatase-Aktivitätsassay nach Immunpräzipitation der SHP-1 aus kultivierten Endothelzellen zeigte sich, dass eine Stimulation mit $\text{TNF}\alpha$ bereits nach kurzer Zeit die katalytische Aktivität der SHP-1 signifikant erhöhte. Nach länger andauernder Stimulation bewirkte $\text{TNF}\alpha$ schließlich auch eine erhöhte Proteinexpression der SHP-1 in humanen Endothelzellen.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die endotheliale Tyrosinphosphatase SHP-1 eine wichtige Rolle für die vaskuläre Hämostase *in vivo* spielt. Dies scheint insbesondere unter inflammatorischen Bedingungen von Bedeutung zu sein, wobei die SHP-1 in Endothelzellen durch $\text{TNF}\alpha$ aktiviert werden kann und hier möglicherweise im Sinne eines autoinhibitorischen Feedback-Mechanismus der Vermeidung einer überschießenden Entzündungsantwort mit Thrombusbildung dient. Eine $\text{TNF}\alpha$ -induzierte Expression der SHP-1 auf Proteinebene nach längerer Stimulationszeit lässt zudem auf eine Funktion im Rahmen chronischer vaskulärer Entzündungsprozesse schließen.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Erkenntnisse aus dieser Arbeit beleuchten im engeren Sinne die Bedeutung der SHP-1 in vaskulären Endothelzellen. Im weiteren Sinne sollen sie aber auch zu einem besseren Verständnis der Rolle inflammatorischer Prozesse im Rahmen kardiovaskulärer Ereignisse beitragen, welche weiterhin einen interessanten therapeutischen Angriffspunkt darstellen.

7 APPENDIX

7.1 Tabellenverzeichnis

Tabelle A1: Verwendete Anästhetika für Mausemnarkose

Anästhetika	
Midazolam	5 mg/kg Körpergewicht
Medetomidinhydrochlorid	0,5 mg/kg Körpergewicht
Fentanyl	0,05 mg/kg Körpergewicht

Tabelle A2: Citrat-Glucose-Lösung für Blutentnahme zur Thrombozytenisolierung

Citrat-Glucose-Lösung	
Citrat	38 mmol/l
Trisodiumcitrat	75 mmol/l
D-Glucose	100 mmol/l

APPENDIX

Tabelle A3: Calciumfreier Puffer zur Thrombozytenisolierung

Calciumfreier Puffer zur Thrombozytenisolierung	
NaCl	138 mmol/l
NaHCO ₃	12 mmol/l
KCl	2,7 mmol/l
MgCl ₂ x 6H ₂ O	0,49 mmol/l
NaH ₂ PO ₄	0,4 mmol/l
D-Glucose	5 mmol/l
Hepes	5 mmol/l
pH 7,35	

Tabelle A4: Phosphatgepufferte Salzlösung (mit und ohne Calcium)

	PBS +	PBS -
NaCl	137 mmol/l	137 mmol/l
Na ₂ HPO ₄	10 mmol/l	10 mmol/l
KCL	2,7 mmol/l	2,7 mmol/l
KH ₂ PO ₄	1,8 mmol/l	1,8 mmol/l
MgCl ₂ ·H ₂ O	0,5 mmol/l	
CaCl ₂ ·H ₂ O	1 mmol/l	
	pH 7,4	pH 7,4

APPENDIX

Tabelle A5: Nährmedium für kultivierte HUVEC

HUVEC Nährmedium 10%	HUVEC Nährmedium 1%
DMEM-199	DMEM-199
Neugeborenen-Kälberserum 20%	Neugeborenen-Kälberserum 1%
Endotheliales Wachstumsmedium 10%	
Penicillin / Streptomycin 1%	Penicillin / Streptomycin 1%
pH 7,4	pH 7,4

Tabelle A6: Nährmedium für kultivierte PAEC

PAEC Nährmedium 10%	PAEC Nährmedium 1%
DMEM-199	DMEM-199
Fetales Kälberserum 10 %	Fetales Kälberserum 1 %
Penicillin / Streptomycin / Amphotericin B 1%	Penicillin / Streptomycin / Amphotericin B 1%
pH 7,4	pH 7,4

APPENDIX

Tabelle A7: Lysepuffer für die Herstellung von Zelllysaten für *western blots*

Lysepuffer (Lysate für <i>western blots</i>)	
KH ₂ PO ₄	20 mmol/l
EDTA	1 mmol/l
Pefablock	1 mmol/l
Leupeptin	1 µmol/l
Pepstatin	1 µmol/l
NaF	50 mmol/l
Na ₄ P ₂ O ₇	40 mmol/l
Na ₃ VO ₄	2 mmol/l
pH 7,4	
Triton X-100 1%, Zugabe direkt vor Verwendung	

APPENDIX

Tabelle A8: Trenn- und Sammelgel für Gelelektrophorese

	Trenngel 10%	Sammelgel 10%
Aqua dest.	20 ml	6 ml
Tris 1,5 mol/l pH 8,8	12,5 ml	
Tris 0,5 mol/l pH 8,8		2,5 ml
Natriumdodecylsulfat 10 %	0,5 ml	0,1 ml
Acrylamid/Bisacrylamid 30 % / 0,8 % (w/v)	16,6 ml	1,3 ml
Ammoniumpersulfat 10 % (w/v)	0,25 ml	0,05 ml
TEMED	0,025 ml	0,01 ml

Tabelle A9: Ladepuffer für Gelelektrophorese

Ladepuffer 4x	
Tris HCl pH 6,8	0,25 mol/l
SDS	8 %
Glycin	40 %
Bromphenolblau	0,02 %
Mercaptoethanol	400 mmol/l

APPENDIX

Tabelle A10: Laufpuffer für Gelelektrophorese

Laufpuffer	
Tris –Base	123,8 mmol/l
SDS	17,3 mmol/l
Glycin	959,1 mmol/l
Vor Verwendung 1:5 in Aqua dest. verdünnen und mit 20 % Methanol versetzen	

Tabelle A11: Transferpuffer für *tank blotting*

Transferpuffer	
Tris –Base	48 mmol/l
SDS	0,037 %
Glycin	39 mmol/l
Methanol	10 %

Tabelle A12: *Blocking* Puffer mit Bovinem Serumalbumin für *western blots*

<i>Blocking</i> Puffer	
Bovines Serumalbumin (BSA)	10 % in TBS/T

APPENDIX

Tabelle A13: Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween für *western blots*

Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween (TBS/T)	
Tris-gepufferte Salzlösung (TBS) 10x	
Tris	24,2 g
NaCl	58,44 g
Aqua dest.	Ad 1000 ml
TBS	1x
Tween 20	0,1 %
pH 7,6	

Tabelle A14: Entwicklungsreagenz für Chemilumineszenz der *western blots*

Entwicklungsreagenz	
Tris 1 mmol/l pH 8,5	500 ml
Luminol	50 ml
p-Coumarsäure	22 µl
H ₂ O ₂	3 µl
Aqua dest.	4,5 ml

APPENDIX

Tabelle A15: Lysepuffer für die Herstellung von Zelllysaten für Immunpräzipitation und Aktivitätsassay

Lysepuffer (Lysate für Aktivitätsassay)	
Tris	20 mmol/l
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	1 mmol/l
Na ₄ P ₂ O ₇ (Natriumpyrophosphat)	10 mmol/l
Leupeptin	1 µmol/l
Pepstatin	1 µmol/l
NaF (Natriumfluorid)	50 mmol/l
Na ₃ VO ₄ (Natriumorthovanadat)	1 mmol/l
pH 7,4	
Triton X-100	1%
DOC (Deoxycholsäure)	0,5%
Die Detergenzien Triton und DOC wurden als 10% Stock-Lösung bei -20°C aufbewahrt und direkt vor Gebrauch dem Lysepuffer hinzugefügt.	

APPENDIX

Tabelle A16: Waschpuffer für Immunpräzipitation mittels magnetischer Beads

Waschpuffer	
Tris	20 mmol/l
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	1 mmol/l
Na ₄ P ₂ O ₇ (Natriumpyrophosphat)	10 mmol/l
Leupeptin	1 µmol/l
Pepstatin	1 µmol/l
pH 7,4	

Tabelle A17: Phosphatasepuffer für Immunpräzipitation mittels magnetischer Beads und Aktivitätsassay

Phosphatasepuffer	
Hepes	20 mmol/l
NaCl	100 mmol/l
MgCl ₂	5 mmol/l
MnCl ₂	5 mmol/l
pH 6,5	
Da Manganchlorid leicht ausfällt, wurde es zunächst in Aqua dest. vorgelöst und anschließend mit den restlichen gelösten Chemikalien gemischt.	

APPENDIX

Tabelle A18: Para-Nitrophenylphosphat (pNPP)-Lösung für Aktivitätsassay

Para-Nitrophenylphosphat (pNPP)-Lösung 10 mmol/l	
pNPP	5 mg (1 Tablette)
Phosphatasepuffer	1347 µl
Eine Tablette pNPP wurde in Phosphatasepuffer in einem Reagenzgefäß lichtgeschützt für mindestens 1 Stunde auf einem Schüttler aufgelöst.	

7.2 Verwendete Substanzen und Chemikalien

Tabelle A19: Puffer und physiologische Lösungen

CaCl ₂	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
D-Glucose	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Glycerin	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Glycin	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Hepes	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
KCl	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
KH ₂ PO ₄	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
MgCl ₂	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Na ₂ HPO ₄	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
NaCl	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Tris	Applichem (Darmstadt, Deutschland)

APPENDIX

Tabelle A20: Zellkultur

Accutase	PAA (Cölbe, Deutschland)
DMEM199 Medium	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
EDTA	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom (Berlin, Deutschland)
Kollagenase	Roche (Basel, Schweiz)
Neugeborenen-Kälberserum (NBCS)	Biochrom (Berlin, Deutschland)
Penicillin-Streptomycin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Trypsin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Trypsin-EDTA	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Wachstumsmedium für Endothelzellen	Promocell (Heidelberg, Deutschland)

APPENDIX

Tabelle A21: Chemikalien und Farbstoffe

Acrylamid	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Ammoniumpersulfat	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
BCA Reagenz	Thermo Scientific (Rockford, IL, USA)
Betamercaptoethanol	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Bovines Serum Albumin (BSA)	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Bromphenolblau	Merck Chemicals Ltd. (Nottingham, UK)
CFDA-SE	Bachem AG (Bubendorf, Schweiz)
Cytochrom C	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
FACS-Lyse-Lösung	BD (Franklin Lakes, NJ, USA),
Fe ₃ Cl ₂	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
FITC-Dextran	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Hydrogenperoxid	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Ilomedin	Schering (Berlin, Deutschland)
Leupeptin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Luminol	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Methanol	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Natriumcitrat	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
NaF	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Natriumorthovanadat (Na ₃ VO ₄)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Natriumpyrophosphat (Na ₄ O ₇ P ₂)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Nitrocellulose Blocker-Membran	PEQLAB Biotechnologie GMBH (Erlangen, Deutschland)

APPENDIX

Paraformaldehyd	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Pefablock	Roche (Basel, Schweiz)
Pepstatin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Proteingrößenmarker (gefärbt)	Fermentas GmbH (St. Leon-Roth, Deutschland)
Reagenzien für Multiplate-Analyse	Dynabyte (München, Deutschland)
RLT Puffer	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Sodiumstibugluconat (SS)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Superoxide dismutase (SOD)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Temed	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Triton	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Tween	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Wasserstoffperoxid	Applichem (Darmstadt, Deutschland)

Tabelle A22: Zytokine und Thrombozytenagonisten

Adenosindiphosphat (ADP)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Collagen	Nycomed GmbH (Konstanz, Deutschland)
TNF α (human)	Reliatech GMBH (Wolfenbüttel, Deutschland)
TNF α (murin)	Chemicon International (Billerica, USA)
<i>Thrombin Receptor Activating Protein</i> (TRAP)	Bachem AG (Bubendorf, Schweiz)

APPENDIX

Tabelle A23: Anästhetika

Fentanyl	CuraMED Pharma GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Medetomidinhydrochlorid	Orion Pharma (Espoo, Finnland)
Midazolam	Ratiopharm GmbH (Ulm, Deutschland)
Natrium-Pentobarbital	Merial GmbH (Hallbergmoos, Deutschland)

Tabelle A24: Antikörper für *western blotting* und Immunpräzipitation

Zielstruktur	Label	Spezies	Firma
Anti-human SHP-1 (C19)		Kaninchen	Santa Cruz (Santa Cruz, USA)
Anti-human phospho-SHP-1 (Y564)		Kaninchen	Abcam (Cambridge, UK)
Anti-human GAPDH		Maus	Millipore (Billerica, USA)
Anti-Kaninchen	HRP	Ziege	Calbiochem (Darmstadt, Deutschland)
Anti-Maus	HRP	Ziege	Calbiochem (Darmstadt, Deutschland)

Tabelle A25: Antikörper für Durchflusszytometrie

Ziel	Marker	Spezies	Firma
Anti-human P-Selectin	RPE	Maus	Abd Serotec (Oxford, UK)
Anti-human vWF	FITC	Maus	Abd Serotec (Oxford, UK)
Isotypkontrolle	RPE	Maus	Abd Serotec (Oxford, UK)
Isotypkontrolle	FITC	Maus	Abd Serotec (Oxford, UK)

7.3 Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
ALL	Akute lymphatische Leukämie
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> (Varianzanalyse)
AU	<i>Arbitrary units</i>
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	Bovines Serumalbumin
CD40L	CD40 Ligand
CFDA-SE	<i>Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester</i>
CML	Chronisch myeloische Leukämie
Da	Dalton
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
DOC	Deoxycholsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GPIIb/IIIa	Glykoprotein IIb/IIIa
GPVI	Glykoprotein VI
GTP	Guanosintriphosphat
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
HUVEC	<i>Human umbilical vein endothelial cells</i> (Humane Endothelzellen aus der Nabelschnurvene)
ICAM-1	<i>Intercellular adhesion molecule-1</i>
IL	Interleukin
ITIM	<i>Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif</i>
Jak	Januskinase
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i> (CCL2)
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat

APPENDIX

NBCS	Neugeborenen-Kälberserum
NF- κ B	<i>Nuclear factor κB</i>
NO	Stickstoffmonoxid
NSAID	<i>Nonsteroidal anti-inflammatory drugs</i> (Nichtsteroidale Entzündungshemmer)
PAEC	<i>Porcine aortic endothelial cells</i> (Porcine Endothelzellen aus der Aorta)
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PECAM-1	<i>Platelet endothelial cell adhesion molecule-1</i>
PI3	Phosphoinositid-3
pNPP	Para-Nitrophenylphosphat
PPP	<i>Platelet poor plasma</i> (Plättchenarmes Plasma)
PRP	<i>Platelet rich plasma</i> (Plättchenreiches Plasma)
PSGL-1	P-Selectin Glykoprotein Ligand-1
PTP	Proteintyrosinphosphatase
RANTES	<i>Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted</i> (CCL5)
Rac1	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> (Reaktive Sauerstoffspezies)
RPE	R-Phycoerythrin
rpm	rounds per minute
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEM	<i>Standard error of the mean</i> (Standardfehler)
SHP-1	<i>Src homology region 2 domain-containing phosphatase-1</i>
SHP-2	<i>Src homology region 2 domain-containing phosphatase-2</i>
SS	<i>Sodium Stibogluconate</i> (Natrium Stibogluconate)
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TF	<i>Tissue Factor</i> (Gewebefaktor)
TNFR	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
TNF α	Tumornekrosefaktor α
TRAP	<i>Thrombin receptor activating peptide</i>
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule-1</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>

APPENDIX

VEGFR	<i>Vascular endothelial growth factor receptor</i>
vWF	von Willebrand Faktor

7.4 Literatur

1. Plass D, Vos T, Hornberg C, Scheidt-Nave C, Zeeb H, Kramer A. Trends in disease burden in Germany: results, implications and limitations of the Global Burden of Disease study. *Deutsches Arzteblatt international*. 2014 Sep 19;111(38):629-38. PubMed PMID: 25316518. Pubmed Central PMCID: 4199248.
2. Statistisches Bundesamt (Destatis). Todesursachen in Deutschland. 2017 19.01.2017. Report No.
3. Kampf J, Yagensky A, Zdrojewski T, Windecker S, Meier B, Pavelko M, et al. Long-term outcomes after acute myocardial infarction in countries with different socioeconomic environments: an international prospective cohort study. *BMJ open*. 2017 Aug 11;7(8):e012715. PubMed PMID: 28801383.
4. Forouzanfar MH, Moran AE, Flaxman AD, Roth G, Mensah GA, Ezzati M, et al. Assessing the global burden of ischemic heart disease, part 2: analytic methods and estimates of the global epidemiology of ischemic heart disease in 2010. *Global heart*. 2012 Dec 01;7(4):331-42. PubMed PMID: 23505617. Pubmed Central PMCID: 3595103.
5. Nava E, Llorens S. The paracrine control of vascular motion. A historical perspective. *Pharmacological research*. 2016 Nov;113(Pt A):125-45. PubMed PMID: 27530204. Epub 2016/10/21. eng.
6. Sagripanti A, Carpi A. Antithrombotic and prothrombotic activities of the vascular endothelium. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 2000 Mar;54(2):107-11. PubMed PMID: 10759296.
7. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. 1987 Jun 11-17;327(6122):524-6. PubMed PMID: 3495737.
8. Landmesser U, Hornig B, Drexler H. Endothelial function: a critical determinant in atherosclerosis? *Circulation*. 2004 Jun 01;109(21 Suppl 1):II27-33. PubMed PMID: 15173060.
9. Wolin MS, Gupte SA, Oeckler RA. Superoxide in the vascular system. *J Vasc Res*. 2002 May-Jun;39(3):191-207. PubMed PMID: 12097818. Epub 2002/07/05. eng.
10. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews*. 2002 Jan;82(1):47-95. PubMed PMID: 11773609. Epub 2002/01/05. eng.
11. Montezano AC, Touyz RM. Reactive oxygen species and endothelial function--role of nitric oxide synthase uncoupling and Nox family nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidases. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*. 2012 Jan;110(1):87-94. PubMed PMID: 21883939. Epub 2011/09/03. eng.
12. Griendling KK, Sorescu D, Lassegue B, Ushio-Fukai M. Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000 Oct;20(10):2175-83. PubMed PMID: 11031201. Epub 2000/10/14. eng.
13. Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res*. 2000 Mar 17;86(5):494-501. PubMed PMID: 10720409. Epub 2000/03/17. eng.

APPENDIX

14. Garczorz W, Francuz T, Siemianowicz K, Kosowska A, Klych A, Aghdam MR, et al. Effects of incretin agonists on endothelial nitric oxide synthase expression and nitric oxide synthesis in human coronary artery endothelial cells exposed to TNFalpha and glycated albumin. *Pharmacol Rep.* 2015 Feb;67(1):69-77. PubMed PMID: 25560578. Epub 2015/01/07. eng.
15. Castellon X, Bogdanova V. Chronic Inflammatory Diseases and Endothelial Dysfunction. *Aging Dis.* 2016 Jan;7(1):81-9. PubMed PMID: 26815098. Pubmed Central PMCID: 4723236. Epub 2016/01/28. eng.
16. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1975 Sep;72(9):3666-70. PubMed PMID: 1103152. Pubmed Central PMCID: 433057. Epub 1975/09/01. eng.
17. Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol.* 2003 Sep;3(9):745-56. PubMed PMID: 12949498. Epub 2003/09/02. eng.
18. Bazzoni F, Beutler B. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N Engl J Med.* 1996 Jun 27;334(26):1717-25. PubMed PMID: 8637518. Epub 1996/06/27. eng.
19. Cabal-Hierro L, Lazo PS. Signal transduction by tumor necrosis factor receptors. *Cell Signal.* 2012;24(6):1297-305.
20. Pfeffer K, Matsuyama T, Kundig TM, Wakeham A, Kishihara K, Shahinian A, et al. Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to *L. monocytogenes* infection. *Cell.* 1993 May 7;73(3):457-67. PubMed PMID: 8387893. Epub 1993/05/07. eng.
21. Hehlgans T, Pfeffer K. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology.* 2005 May;115(1):1-20. PubMed PMID: 15819693. Pubmed Central PMCID: 1782125. Epub 2005/04/12. eng.
22. Erickson SL, de Sauvage FJ, Kikly K, Carver-Moore K, Pitts-Meek S, Gillett N, et al. Decreased sensitivity to tumour-necrosis factor but normal T-cell development in TNF receptor-2-deficient mice. *Nature.* 1994 Dec 8;372(6506):560-3. PubMed PMID: 7990930. Epub 1994/12/08. eng.
23. Waters JP, Pober JS, Bradley JR. Tumour necrosis factor in infectious disease. *J Pathol.* 2013;230(2):132-47.
24. Tartaglia LA, Weber RF, Figari IS, Reynolds C, Palladino MA, Jr., Goeddel DV. The two different receptors for tumor necrosis factor mediate distinct cellular responses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Oct 15;88(20):9292-6. PubMed PMID: 1718003. Pubmed Central PMCID: 52700. Epub 1991/10/25. eng.
25. Rahman MM, McFadden G. Modulation of tumor necrosis factor by microbial pathogens. *PLoS Pathog.* 2006;2(2).
26. Lin PL, Plessner HL, Voitenok NN, Flynn JL. Tumor necrosis factor and tuberculosis. The journal of investigative dermatology Symposium proceedings. 2007 May;12(1):22-5. PubMed PMID: 17502865. Epub 2007/05/16. eng.
27. Wong M, Ziring D, Korin Y, Desai S, Kim S, Lin J, et al. TNFalpha blockade in human diseases: mechanisms and future directions. *Clin Immunol.* 2008 Feb;126(2):121-36. PubMed PMID: 17916444. Pubmed Central PMCID: 2291518. Epub 2007/10/06. eng.
28. Scott DL, Kingsley GH. Tumor necrosis factor inhibitors for rheumatoid arthritis. *N Engl J Med.* 2006 Aug 17;355(7):704-12. PubMed PMID: 16914706. Epub 2006/08/18. eng.

APPENDIX

29. Popa C, Netea MG, van Riel PL, van der Meer JW, Stalenhoef AF. The role of TNF-alpha in chronic inflammatory conditions, intermediary metabolism, and cardiovascular risk. *Journal of lipid research*. 2007 Apr;48(4):751-62. PubMed PMID: 17202130.
30. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999 Jan 14;340(2):115-26. PubMed PMID: 9887164. Epub 1999/01/14. eng.
31. Libby P. Inflammation and cardiovascular disease mechanisms. *Am J Clin Nutr*. 2006 Feb;83(2):456S-60S. PubMed PMID: 16470012. Epub 2006/02/14. eng.
32. Fischer LM, Schlienger RG, Matter C, Jick H, Meier CR. Effect of rheumatoid arthritis or systemic lupus erythematosus on the risk of first-time acute myocardial infarction. *Am J Cardiol*. 2004 Jan 15;93(2):198-200. PubMed PMID: 14715346. Epub 2004/01/13. eng.
33. Libby P. Role of inflammation in atherosclerosis associated with rheumatoid arthritis. *The American journal of medicine*. 2008 Oct;121(10 Suppl 1):S21-31. PubMed PMID: 18926166. Epub 2008/10/24. eng.
34. Poredos P, Spirkoska A, Lezaic L, Mijovski MB, Jezovnik MK. Patients with an Inflamed Atherosclerotic Plaque have Increased Levels of Circulating Inflammatory Markers. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*. 2017 Jan 01;24(1):39-46. PubMed PMID: 27237221. Pubmed Central PMCID: 5225131.
35. Ridker PM, Rifai N, Pfeffer M, Sacks F, Lepage S, Braunwald E. Elevation of tumor necrosis factor-alpha and increased risk of recurrent coronary events after myocardial infarction. *Circulation*. 2000 May 09;101(18):2149-53. PubMed PMID: 10801754.
36. Ohta H, Wada H, Niwa T, Kirii H, Iwamoto N, Fujii H, et al. Disruption of tumor necrosis factor-alpha gene diminishes the development of atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Atherosclerosis*. 2005 May;180(1):11-7. PubMed PMID: 15823270. Epub 2005/04/13. eng.
37. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002 Dec 19-26;420(6917):868-74. PubMed PMID: 12490960. Epub 2002/12/20. eng.
38. Yoshida H, Yilmaz CE, Granger DN. Role of tumor necrosis factor-alpha in the extraintestinal thrombosis associated with colonic inflammation. *Inflammatory bowel diseases*. 2011 Nov;17(11):2217-23. PubMed PMID: 21987296. Pubmed Central PMCID: PMC3123669. Epub 2011/10/12. eng.
39. Pircher J, Merkle M, Wornle M, Ribeiro A, Czermak T, Stampnik Y, et al. Prothrombotic effects of tumor necrosis factor alpha in vivo are amplified by the absence of TNF-alpha receptor subtype 1 and require TNF-alpha receptor subtype 2. *Arthritis Res Ther*. 2012;14(5):R225. PubMed PMID: 23079185. Pubmed Central PMCID: 3580536. Epub 2012/10/20. eng.
40. Breitenstein A, Tanner FC, Luscher TF. Tissue factor and cardiovascular disease: quo vadis? *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society*. 2010 Jan;74(1):3-12. PubMed PMID: 19996531. Epub 2009/12/10. eng.
41. Polgar J, Matuskova J, Wagner DD. The P-selectin, tissue factor, coagulation triad. *J Thromb Haemost*. 2005 Aug;3(8):1590-6. PubMed PMID: 16102023. Epub 2005/08/17. eng.
42. Poulter NS, Pollitt AY, Owen DM, Gardiner EE, Andrews RK, Shimizu H, et al. Clustering of glycoprotein VI (GPVI) dimers upon adhesion to collagen as a mechanism to regulate GPVI signaling in platelets. *J Thromb Haemost*. 2017 Mar;15(3):549-64. PubMed PMID: 28058806. Pubmed Central PMCID: 5347898.

APPENDIX

43. Grothusen C, Umbreen S, Konrad I, Stellos K, Schulz C, Schmidt B, et al. EXP3179 inhibits collagen-dependent platelet activation via glycoprotein receptor-VI independent of AT1-receptor antagonism: potential impact on atherothrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007 May;27(5):1184-90. PubMed PMID: 17347483.
44. Shin EK, Park H, Noh JY, Lim KM, Chung JH. Platelet Shape Changes and Cytoskeleton Dynamics as Novel Therapeutic Targets for Anti-Thrombotic Drugs. *Biomolecules & therapeutics.* 2017 May 01;25(3):223-30. PubMed PMID: 27871158. Pubmed Central PMCID: 5424631.
45. Ollivier V, Syvannarath V, Gros A, Butt A, Loyau S, Jandrot-Perrus M, et al. Collagen can selectively trigger a platelet secretory phenotype via glycoprotein VI. *PLoS One.* 2014;9(8):e104712. PubMed PMID: 25116206. Pubmed Central PMCID: 4130581.
46. Weisel JW, Nagaswami C, Vilaire G, Bennett JS. Examination of the platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex and its interaction with fibrinogen and other ligands by electron microscopy. *J Biol Chem.* 1992 Aug 15;267(23):16637-43. PubMed PMID: 1644841.
47. Calvete JJ. On the structure and function of platelet integrin alpha IIb beta 3, the fibrinogen receptor. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine.* 1995 Apr;208(4):346-60. PubMed PMID: 7535429.
48. Ruggeri ZM. Platelets in atherothrombosis. *Nature medicine.* 2002 Nov;8(11):1227-34. PubMed PMID: 12411949.
49. Hou Y, Carrim N, Wang Y, Gallant RC, Marshall A, Ni H. Platelets in hemostasis and thrombosis: Novel mechanisms of fibrinogen-independent platelet aggregation and fibronectin-mediated protein wave of hemostasis. *J Biomed Res.* 2015 Oct 30;29. PubMed PMID: 26541706. Pubmed Central PMCID: 4662204. Epub 2015/11/07. Eng.
50. Massberg S, Schurzinger K, Lorenz M, Konrad I, Schulz C, Plesnila N, et al. Platelet adhesion via glycoprotein IIb integrin is critical for atheroprogession and focal cerebral ischemia: an in vivo study in mice lacking glycoprotein IIb. *Circulation.* 2005 Aug 23;112(8):1180-8. PubMed PMID: 16103235. Epub 2005/08/17. eng.
51. Nording HM, Seizer P, Langer HF. Platelets in inflammation and atherogenesis. *Front Immunol.* 2015;6:98. PubMed PMID: 25798138. Pubmed Central PMCID: 4351644. Epub 2015/03/24. eng.
52. Burger PC, Wagner DD. Platelet P-selectin facilitates atherosclerotic lesion development. *Blood.* 2003 Apr 1;101(7):2661-6. PubMed PMID: 12480714. Epub 2002/12/14. eng.
53. Fuentes QE, Fuentes QF, Andres V, Pello OM, Font de Mora J, Palomo GI. Role of platelets as mediators that link inflammation and thrombosis in atherosclerosis. *Platelets.* 2013;24(4):255-62. PubMed PMID: 22671308. Epub 2012/06/08. eng.
54. Massberg S, Brand K, Gruner S, Page S, Muller E, Muller I, et al. A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation. *J Exp Med.* 2002 Oct 07;196(7):887-96. PubMed PMID: 12370251. Pubmed Central PMCID: 2194025.
55. Pitsilos S, Hunt J, Mohler ER, Prabhakar AM, Poncz M, Dawicki J, et al. Platelet factor 4 localization in carotid atherosclerotic plaques: correlation with clinical parameters. *Thrombosis and haemostasis.* 2003 Dec;90(6):1112-20. PubMed PMID: 14652645.

APPENDIX

56. van Hinsbergh VW. The endothelium: vascular control of haemostasis. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*. 2001 Apr;95(2):198-201. PubMed PMID: 11301171.
57. Lowenstein CJ, Morrell CN, Yamakuchi M. Regulation of Weibel-Palade body exocytosis. *Trends Cardiovasc Med*. 2005 Nov;15(8):302-8. PubMed PMID: 16297768.
58. van Gils JM, Zwaginga JJ, Hordijk PL. Molecular and functional interactions among monocytes, platelets, and endothelial cells and their relevance for cardiovascular diseases. *Journal of leukocyte biology*. 2009 Feb;85(2):195-204. PubMed PMID: 18948548. Epub 2008/10/25. eng.
59. von Hundelshausen P, Schmitt MM. Platelets and their chemokines in atherosclerosis-clinical applications. *Front Physiol*. 2014;5:294. PubMed PMID: 25152735. Pubmed Central PMCID: 4126210. Epub 2014/08/26. eng.
60. Wagner DD, Frenette PS. The vessel wall and its interactions. *Blood*. 2008 Jun 1;111(11):5271-81. PubMed PMID: 18502843. Pubmed Central PMCID: 2396724. Epub 2008/05/27. eng.
61. Breddin HK. Can platelet aggregometry be standardized? *Platelets*. 2005 May-Jun;16(3-4):151-8. PubMed PMID: 16011959.
62. Shen SH, Bastien L, Posner BI, Chretien P. A protein-tyrosine phosphatase with sequence similarity to the SH2 domain of the protein-tyrosine kinases. *Nature*. 1991 Aug 22;352(6337):736-9. PubMed PMID: 1652101. Epub 1991/08/22. eng.
63. Zhang J, Somani AK, Siminovitch KA. Roles of the SHP-1 tyrosine phosphatase in the negative regulation of cell signalling. *Semin Immunol*. 2000 Aug;12(4):361-78. PubMed PMID: 10995583. Epub 2000/09/21. eng.
64. Chong ZZ, Maiese K. The Src homology 2 domain tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2: diversified control of cell growth, inflammation, and injury. *Histol Histopathol*. 2007 Nov;22(11):1251-67. PubMed PMID: 17647198. Pubmed Central PMCID: 2515712. Epub 2007/07/25. eng.
65. Wavreille AS, Garaud M, Zhang Y, Pei D. Defining SH2 domain and PTP specificity by screening combinatorial peptide libraries. *Methods*. 2007 Jul;42(3):207-19. PubMed PMID: 17532507. Pubmed Central PMCID: 2041848. Epub 2007/05/29. eng.
66. Zhang Z, Shen K, Lu W, Cole PA. The role of C-terminal tyrosine phosphorylation in the regulation of SHP-1 explored via expressed protein ligation. *J Biol Chem*. 2003 Feb 14;278(7):4668-74. PubMed PMID: 12468540. Epub 2002/12/07. eng.
67. Pei D, Lorenz U, Klingmuller U, Neel BG, Walsh CT. Intramolecular regulation of protein tyrosine phosphatase SH-PTP1: a new function for Src homology 2 domains. *Biochemistry*. 1994 Dec 27;33(51):15483-93. PubMed PMID: 7528537. Epub 1994/12/27. eng.
68. Pluskey S, Wandless TJ, Walsh CT, Shoelson SE. Potent stimulation of SH-PTP2 phosphatase activity by simultaneous occupancy of both SH2 domains. *J Biol Chem*. 1995 Feb 17;270(7):2897-900. PubMed PMID: 7531695.
69. Xiao W, Ando T, Wang HY, Kawakami Y, Kawakami T. Lyn- and PLC-beta3-dependent regulation of SHP-1 phosphorylation controls Stat5 activity and myelomonocytic leukemia-like disease. *Blood*. 2010 Dec 23;116(26):6003-13. PubMed PMID: 20858858. Pubmed Central PMCID: 3031387.

APPENDIX

70. Unkeless JC, Jin J. Inhibitory receptors, ITIM sequences and phosphatases. *Curr Opin Immunol.* 1997 Jun;9(3):338-43. PubMed PMID: 9203414. Epub 1997/06/01. eng.
71. Daron M, Jaeger S, Du Pasquier L, Vivier E. Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs: a quest in the past and future. *Immunol Rev.* 2008 Aug;224:11-43. PubMed PMID: 18759918. Epub 2008/09/02. eng.
72. Yi TL, Cleveland JL, Ihle JN. Protein tyrosine phosphatase containing SH2 domains: characterization, preferential expression in hematopoietic cells, and localization to human chromosome 12p12-p13. *Mol Cell Biol.* 1992 Feb;12(2):836-46. PubMed PMID: 1732748. Pubmed Central PMCID: 364317. Epub 1992/02/01. eng.
73. Shultz LD, Schweitzer PA, Rajan TV, Yi T, Ihle JN, Matthews RJ, et al. Mutations at the murine motheaten locus are within the hematopoietic cell protein-tyrosine phosphatase (Hcph) gene. *Cell.* 1993 Jul 2;73(7):1445-54. PubMed PMID: 8324828. Epub 1993/07/02. eng.
74. Green MC, Shultz LD. Motheaten, an immunodeficient mutant of the mouse. I. Genetics and pathology. *J Hered.* 1975 Sep-Oct;66(5):250-8. PubMed PMID: 1184950. Epub 1975/09/01. eng.
75. Kozlowski M, Mlinaric-Rascan I, Feng GS, Shen R, Pawson T, Siminovitch KA. Expression and catalytic activity of the tyrosine phosphatase PTP1C is severely impaired in motheaten and viable motheaten mice. *J Exp Med.* 1993 Dec 1;178(6):2157-63. PubMed PMID: 8245788. Pubmed Central PMCID: 2191277. Epub 1993/12/01. eng.
76. Tsui HW, Siminovitch KA, de Souza L, Tsui FW. Motheaten and viable motheaten mice have mutations in the haematopoietic cell phosphatase gene. *Nat Genet.* 1993 Jun;4(2):124-9. PubMed PMID: 8348149. Epub 1993/06/01. eng.
77. Mena-Duran AV, Togo SH, Bazhenova L, Cervera J, Bethel K, Senent ML, et al. SHP1 expression in bone marrow biopsies of myelodysplastic syndrome patients: a new prognostic factor. *Br J Haematol.* 2005 Jun;129(6):791-4. PubMed PMID: 15953006. Epub 2005/06/15. eng.
78. Zhang Q, Raghunath PN, Vonderheid E, Odum N, Wasik MA. Lack of phosphotyrosine phosphatase SHP-1 expression in malignant T-cell lymphoma cells results from methylation of the SHP-1 promoter. *Am J Pathol.* 2000 Oct;157(4):1137-46. PubMed PMID: 11021818. Pubmed Central PMCID: 1850163. Epub 2000/10/06. eng.
79. Sugano M, Tsuchida K, Hata T, Makino N. RNA interference targeting SHP-1 attenuates myocardial infarction in rats. *FASEB J.* 2005 Dec;19(14):2054-6. PubMed PMID: 16223786. Epub 2005/10/15. eng.
80. Korporaal SJ, Koekman CA, Verhoef S, van der Wal DE, Bezemer M, Van Eck M, et al. Downregulation of platelet responsiveness upon contact with LDL by the protein-tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29(3):372-9.
81. Pasquet JM, Quek L, Pasquet S, Poole A, Matthews JR, Lowell C, et al. Evidence of a role for SHP-1 in platelet activation by the collagen receptor glycoprotein VI. *J Biol Chem.* 2000 Sep 15;275(37):28526-31. PubMed PMID: 10871605. Epub 2000/06/29. eng.
82. Blanchette J, Racette N, Faure R, Siminovitch KA, Olivier M. Leishmania-induced increases in activation of macrophage SHP-1 tyrosine phosphatase are associated with impaired IFN-gamma-triggered JAK2 activation. *Eur J Immunol.* 1999 Nov;29(11):3737-44. PubMed PMID: 10556830. Epub 1999/11/11. eng.

APPENDIX

83. Pathak MK, Yi T. Sodium stibogluconate is a potent inhibitor of protein tyrosine phosphatases and augments cytokine responses in hemopoietic cell lines. *J Immunol.* 2001 Sep 15;167(6):3391-7. PubMed PMID: 11544330. Epub 2001/09/07. eng.
84. Forget G, Matte C, Siminovitch KA, Rivest S, Pouliot P, Olivier M. Regulation of the Leishmania-induced innate inflammatory response by the protein tyrosine phosphatase SHP-1. *Eur J Immunol.* 2005 Jun;35(6):1906-17. PubMed PMID: 15902687. Epub 2005/05/20. eng.
85. Khaled AR, Butfiloski EJ, Sobel ES, Schiffenbauer J. Functional consequences of the SHP-1 defect in motheaten viable mice: role of NF-kappa B. *Cell Immunol.* 1998 Apr 10;185(1):49-58. PubMed PMID: 9636682. Epub 1998/06/24. eng.
86. Thrall RS, Vogel SN, Evans R, Shultz LD. Role of tumor necrosis factor-alpha in the spontaneous development of pulmonary fibrosis in viable motheaten mutant mice. *Am J Pathol.* 1997 Nov;151(5):1303-10. PubMed PMID: 9358756. Pubmed Central PMCID: 1858072. Epub 1997/11/14. eng.
87. Cho SH, Oh SY, Lane AP, Lee J, Oh MH, Lee S, et al. Regulation of nasal airway homeostasis and inflammation in mice by SHP-1 and Th2/Th1 signaling pathways. *PLoS One.* 2014;9(8).
88. Zhou L, Oh SY, Zhou Y, Yuan B, Wu F, Oh MH, et al. SHP-1 regulation of mast cell function in allergic inflammation and anaphylaxis. *PLoS One.* 2013;8(2):4.
89. Forget G, Gregory DJ, Whitcombe LA, Olivier M. Role of host protein tyrosine phosphatase SHP-1 in Leishmania donovani-induced inhibition of nitric oxide production. *Infect Immun.* 2006 Nov;74(11):6272-9. PubMed PMID: 17057094. Pubmed Central PMCID: 1695482. Epub 2006/10/24. eng.
90. Krotz F, Engelbrecht B, Buerkle MA, Bassermann F, Bridell H, Gloe T, et al. The tyrosine phosphatase, SHP-1, is a negative regulator of endothelial superoxide formation. *J Am Coll Cardiol.* 2005 May 17;45(10):1700-6. PubMed PMID: 15893190. Epub 2005/05/17. eng.
91. Diehl KH, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, et al. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *Journal of applied toxicology : JAT.* 2001 Jan-Feb;21(1):15-23. PubMed PMID: 11180276.
92. Menger MD, Laschke MW, Vollmar B. Viewing the microcirculation through the window: some twenty years experience with the hamster dorsal skinfold chamber. *Eur Surg Res.* 2002 Jan-Apr;34(1-2):83-91. PubMed PMID: 11867907. Epub 2002/02/28. eng.
93. Born GV. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature.* 1962 Jun 9;194:927-9. PubMed PMID: 13871375.
94. Santos-Martinez MJ, Prina-Mello A, Medina C, Radomski MW. Analysis of platelet function: role of microfluidics and nanodevices. *The Analyst.* 2011 Dec 21;136(24):5120-6. PubMed PMID: 22029043.
95. Calatzis A. LR, Spannagl M. Multiplate® platelet function analysis - application and interpretation. In: Ludwig-Maximilians University Munich , Westpfalz-Klinikum Kaiserslautern, editors. 2007.
96. Saren P, Welgus HG, Kovanen PT. TNF-alpha and IL-1beta selectively induce expression of 92-kDa gelatinase by human macrophages. *J Immunol.* 1996 Nov 01;157(9):4159-65. PubMed PMID: 8892653.

APPENDIX

97. Kishikawa H, Shimokama T, Watanabe T. Localization of T lymphocytes and macrophages expressing IL-1, IL-2 receptor, IL-6 and TNF in human aortic intima. Role of cell-mediated immunity in human atherogenesis. *Virchows Archiv A, Pathological anatomy and histopathology*. 1993;423(6):433-42. PubMed PMID: 8291216.
98. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2005 Apr 21;352(16):1685-95. PubMed PMID: 15843671.
99. Libby P, Ridker PM, Hansson GK, Leducq Transatlantic Network on A. Inflammation in atherosclerosis: from pathophysiology to practice. *J Am Coll Cardiol*. 2009 Dec 01;54(23):2129-38. PubMed PMID: 19942084. Pubmed Central PMCID: 2834169.
100. Lehr HA, Leunig M, Menger MD, Nolte D, Messmer K. Dorsal skinfold chamber technique for intravital microscopy in nude mice. *Am J Pathol*. 1993 Oct;143(4):1055-62. PubMed PMID: 7692730. Pubmed Central PMCID: 1887078. Epub 1993/10/01. eng.
101. Endrich B, Asaishi K, Gotz A, Messmer K. Technical report--a new chamber technique for microvascular studies in unanesthetized hamsters. *Res Exp Med (Berl)*. 1980;177(2):125-34. PubMed PMID: 7003665. Epub 1980/01/01. eng.
102. Funk W, Endrich B, Messmer K. A novel method for follow-up studies of the microcirculation in non-malignant tissue implants. *Res Exp Med (Berl)*. 1986;186(4):259-70. PubMed PMID: 2429353. Epub 1986/01/01. eng.
103. Sandison J. A new method for the microscopic study of living growing tissues by the introduction of a transparent chamber in the rabbit's ear. *Ana Rec*. 1924;28(4):281-7.
104. Baron VT, Welsh J, Abedinpour P, Borgstrom P. Intravital microscopy in the mouse dorsal chamber model for the study of solid tumors. *American journal of cancer research*. 2011;1(5):674-86. PubMed PMID: 21994905. Pubmed Central PMCID: 3189827.
105. Maeda A, Chen Y, Bu J, Mujcic H, Wouters BG, DaCosta RS. In Vivo Imaging Reveals Significant Tumor Vascular Dysfunction and Increased Tumor Hypoxia-Inducible Factor-1alpha Expression Induced by High Single-Dose Irradiation in a Pancreatic Tumor Model. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2017 Jan 01;97(1):184-94. PubMed PMID: 27816364.
106. Sckell A, Leunig M. Dorsal Skinfold Chamber Preparation in Mice: Studying Angiogenesis by Intravital Microscopy. *Methods in molecular biology*. 2016;1430:251-63. PubMed PMID: 27172959.
107. Matthews RJ, Bowne DB, Flores E, Thomas ML. Characterization of hematopoietic intracellular protein tyrosine phosphatases: description of a phosphatase containing an SH2 domain and another enriched in proline-, glutamic acid-, serine-, and threonine-rich sequences. *Mol Cell Biol*. 1992 May;12(5):2396-405. PubMed PMID: 1373816. Pubmed Central PMCID: 364412. Epub 1992/05/01. eng.
108. Struthmann L, Hellwig N, Pircher J, Sohn HY, Buerkle MA, Klauss V, et al. Prothrombotic effects of diclofenac on arteriolar platelet activation and thrombosis in vivo. *J Thromb Haemost*. 2009 Oct;7(10):1727-35. PubMed PMID: 19691487. Epub 2009/08/21. eng.
109. Buerkle MA, Lehrer S, Sohn HY, Conzen P, Pohl U, Krotz F. Selective inhibition of cyclooxygenase-2 enhances platelet adhesion in hamster arterioles in vivo. *Circulation*. 2004 Oct 05;110(14):2053-9. PubMed PMID: 15451781.
110. Gudbjornsson B, Thorsteinsson SB, Sigvaldason H, Einarsdottir R, Johannsson M, Zoega H, et al. Rofecoxib, but not celecoxib, increases the risk of thromboembolic cardiovascular

APPENDIX

- events in young adults-a nationwide registry-based study. *European journal of clinical pharmacology*. 2010 Jun;66(6):619-25. PubMed PMID: 20157701.
111. Davi G, Patrono C. Platelet activation and atherothrombosis. *N Engl J Med*. 2007 Dec 13;357(24):2482-94. PubMed PMID: 18077812. Epub 2007/12/14. eng.
 112. Huo Y, Weber C, Forlow SB, Sperandio M, Thatte J, Mack M, et al. The chemokine KC, but not monocyte chemoattractant protein-1, triggers monocyte arrest on early atherosclerotic endothelium. *The Journal of clinical investigation*. 2001 Nov;108(9):1307-14. PubMed PMID: 11696575. Pubmed Central PMCID: 209441.
 113. Martin JP, Logsdon N. Oxygen radicals mediate cell inactivation by acridine dyes, fluorescein, and lucifer yellow CH. *Photochemistry and photobiology*. 1987 Jul;46(1):45-53. PubMed PMID: 3039547.
 114. Bartlett IS, Segal SS. Resolution of smooth muscle and endothelial pathways for conduction along hamster cheek pouch arterioles. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2000 Feb;278(2):H604-12. PubMed PMID: 10666093.
 115. Whinna HC. Overview of murine thrombosis models. *Thrombosis research*. 2008;122 Suppl 1:S64-9. PubMed PMID: 18691503.
 116. Subramaniam S, Kanse SM. Ferric chloride-induced arterial thrombosis in mice. *Curr Protoc Mouse Biol*. 2014;4(4):151-64. PubMed PMID: 25723183. Epub 2015/02/28. eng.
 117. Bonnard T, Hagemeyer CE. Ferric Chloride-induced Thrombosis Mouse Model on Carotid Artery and Mesentery Vessel. *J Vis Exp*. 2015 (100):e52838. PubMed PMID: 26167713. Epub 2015/07/15. eng.
 118. Ferroni P, Vazzana N, Riondino S, Cuccurullo C, Guadagni F, Davi G. Platelet function in health and disease: from molecular mechanisms, redox considerations to novel therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal*. 2012 Nov 15;17(10):1447-85. PubMed PMID: 22458931. Epub 2012/03/31. eng.
 119. Eckly A, Hechler B, Freund M, Zerr M, Cazenave JP, Lanza F, et al. Mechanisms underlying FeCl₃-induced arterial thrombosis. *J Thromb Haemost*. 2011 Apr;9(4):779-89. PubMed PMID: 21261806.
 120. Berman JD, Wyler DJ. An in vitro model for investigation of chemotherapeutic agents in leishmaniasis. *The Journal of infectious diseases*. 1980 Jul;142(1):83-6. PubMed PMID: 6249874.
 121. Frenette PS, Johnson RC, Hynes RO, Wagner DD. Platelets roll on stimulated endothelium in vivo: an interaction mediated by endothelial P-selectin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Aug 01;92(16):7450-4. PubMed PMID: 7543682. Pubmed Central PMCID: 41357.
 122. Li G, Sanders JM, Phan ET, Ley K, Sarembock IJ. Arterial macrophages and regenerating endothelial cells express P-selectin in atherosclerosis-prone apolipoprotein E-deficient mice. *Am J Pathol*. 2005 Dec;167(6):1511-8. PubMed PMID: 16314466. Pubmed Central PMCID: 1613195.
 123. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res*. 2000 Nov 10;87(10):840-4. PubMed PMID: 11073878.
 124. Takano M, Meneshian A, Sheikh E, Yamakawa Y, Wilkins KB, Hopkins EA, et al. Rapid upregulation of endothelial P-selectin expression via reactive oxygen species generation. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2002 Nov;283(5):H2054-61. PubMed PMID: 12384485.

APPENDIX

125. Husain K, Hernandez W, Ansari RA, Ferder L. Inflammation, oxidative stress and renin angiotensin system in atherosclerosis. *World J Biol Chem.* 2015 Aug 26;6(3):209-17. PubMed PMID: 26322175. Pubmed Central PMCID: 4549761. Epub 2015/09/01. eng.
126. Patel KN, Soubra SH, Bellera RV, Dong JF, McMullen CA, Burns AR, et al. Differential role of von Willebrand factor and P-selectin on microvascular thrombosis in endotoxemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008 Dec;28(12):2225-30. PubMed PMID: 18802014. Pubmed Central PMCID: 2585611.
127. Fan X, Shi P, Dai J, Lu Y, Chen X, Liu X, et al. Paired immunoglobulin-like receptor B regulates platelet activation. *Blood.* 2014 Oct 9;124(15):2421-30. PubMed PMID: 25075127. Pubmed Central PMCID: 4192752. Epub 2014/07/31. eng.
128. Hua CT, Gamble JR, Vadas MA, Jackson DE. Recruitment and activation of SHP-1 protein-tyrosine phosphatase by human platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1). Identification of immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif-like binding motifs and substrates. *J Biol Chem.* 1998;273(43):28332-40.
129. Cicmil M, Thomas JM, Leduc M, Bon C, Gibbins JM. Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 signaling inhibits the activation of human platelets. *Blood.* 2002;99(1):137-44.
130. Patel B, Sharifi M, Milward AD, Oberprieler NG, Gibbins JM, Parkin S, et al. Platelet nitric oxide synthase is activated by tyrosine dephosphorylation: possible role for SHP-1 phosphatase. *J Thromb Haemost.* 2006;4(11):2423-32.
131. Ma P, Cierniewska A, Signarvic R, Cieslak M, Kong H, Sinnamon AJ, et al. A newly identified complex of spinophilin and the tyrosine phosphatase, SHP-1, modulates platelet activation by regulating G protein-dependent signaling. *Blood.* 2012 Feb 23;119(8):1935-45. PubMed PMID: 22210881. Epub 2012/01/03. eng.
132. McVicar DW, Burshtyn DN. Intracellular signaling by the killer immunoglobulin-like receptors and Ly49. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment.* 2001 Mar 27;2001(75):re1. PubMed PMID: 11752646.
133. Dong Q, Siminovitch KA, Fialkow L, Fukushima T, Downey GP. Negative regulation of myeloid cell proliferation and function by the SH2 domain-containing tyrosine phosphatase-1. *J Immunol.* 1999 Mar 15;162(6):3220-30. PubMed PMID: 10092773.
134. Nakagami H, Cui TX, Iwai M, Shiuchi T, Takeda-Matsubara Y, Wu L, et al. Tumor necrosis factor-alpha inhibits growth factor-mediated cell proliferation through SHP-1 activation in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002 Feb 01;22(2):238-42. PubMed PMID: 11834522.
135. Sugano M, Iwasaki Y, Abe M, Maeda T, Tsuchida K, Makino N. TNF-alpha employs a protein-tyrosine phosphatase to inhibit activation of hepatocyte growth factor receptor and hepatocyte growth factor-induced endothelial cell proliferation. *Molecular and cellular biochemistry.* 2009 Feb;322(1-2):113-7. PubMed PMID: 19002656.
136. Pincheira R, Castro AF, Ozes ON, Idumalla PS, Donner DB. Type 1 TNF receptor forms a complex with and uses Jak2 and c-Src to selectively engage signaling pathways that regulate transcription factor activity. *J Immunol.* 2008 Jul 15;181(2):1288-98. PubMed PMID: 18606683.
137. Somani AK, Bignon JS, Mills GB, Siminovitch KA, Branch DR. Src kinase activity is regulated by the SHP-1 protein-tyrosine phosphatase. *J Biol Chem.* 1997 Aug 22;272(34):21113-9. PubMed PMID: 9261115.

APPENDIX

138. Yi T, Gilbert DJ, Jenkins NA, Copeland NG, Ihle JN. Assignment of a novel protein tyrosine phosphatase gene (Hcph) to mouse chromosome 6. *Genomics*. 1992 Nov;14(3):793-5. PubMed PMID: 1427910. Epub 1992/11/01. eng.
139. Mann DL. Targeted anticytokine therapy and the failing heart. *Am J Cardiol*. 2005 Jun 6;95(11A):9C-16C; discussion 38C-40C. PubMed PMID: 15925559. Epub 2005/06/01. eng.
140. Grassi D, Desideri G, Ferri C. Flavonoids: antioxidants against atherosclerosis. *Nutrients*. 2010 Aug;2(8):889-902. PubMed PMID: 22254061. Pubmed Central PMCID: 3257706. Epub 2010/08/01. eng.
141. Siekmeier R, Steffen C, Marz W. Role of oxidants and antioxidants in atherosclerosis: results of in vitro and in vivo investigations. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2007 Dec;12(4):265-82. PubMed PMID: 18172221. Epub 2008/01/04. eng.
142. Tabas I, Glass CK. Anti-inflammatory therapy in chronic disease: challenges and opportunities. *Science*. 2013 Jan 11;339(6116):166-72. PubMed PMID: 23307734. Pubmed Central PMCID: PMC3608517.
143. Varas-Lorenzo C, Riera-Guardia N, Calingaert B, Castellsague J, Salvo F, Nicotra F, et al. Myocardial infarction and individual nonsteroidal anti-inflammatory drugs meta-analysis of observational studies. *Pharmacoepidemiol Drug Saf*. 2013 Jun;22(6):559-70. PubMed PMID: 23616423. Pubmed Central PMCID: PMC3749466.
144. Anwar A, Anwar IJ, Delafontaine P. Elevation of cardiovascular risk by non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Trends Cardiovasc Med*. 2015 Nov;25(8):726-35. PubMed PMID: 25956433.
145. Ridker PM, Everett BM, Thuren T, MacFadyen JG, Chang WH, Ballantyne C, et al. Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *N Engl J Med*. 2017 Sep 21;377(12):1119-31. PubMed PMID: 28845751.
146. Beamer CA, Brooks DM, Lurie DI. Motheaten (me/me) mice deficient in SHP-1 are less susceptible to focal cerebral ischemia. *J Neurosci Res*. 2006 May 15;83(7):1220-30. PubMed PMID: 16528752. Epub 2006/03/11. eng.
147. Won YW, Lee M, Kim HA, Bull DA, Kim SW. Hypoxia-inducible plasmid expressing both miSHP-1 and HO-1 for the treatment of ischemic disease. *J Control Release*. 2013 Jan 10;165(1):22-8. PubMed PMID: 23108071. Pubmed Central PMCID: 3883575. Epub 2012/10/31. eng.
148. Vercauteren M, Remy E, Devaux C, Dautreux B, Henry JP, Bauer F, et al. Improvement of peripheral endothelial dysfunction by protein tyrosine phosphatase inhibitors in heart failure. *Circulation*. 2006 Dec 5;114(23):2498-507. PubMed PMID: 17101854. Epub 2006/11/15. eng.

7.5 Veröffentlichungen

Die Ergebnisse dieser Doktorarbeit wurden in einem wissenschaftlichen Artikel veröffentlicht:

The endothelial tyrosine phosphatase SHP-1 plays an important role for vascular haemostasis in TNF α -induced inflammation in vivo. Koch E, Pircher J, Czermak T, Gaitzsch E, Alig S, Mannell H, Niemeyer M, Krötz F, Wörnle M. Mediators Inflamm. 2013;2013:279781

Die Ergebnisse dieser Doktorarbeit wurden im Rahmen von Posterpräsentationen oder Vorträgen auf folgenden Kongressen vorgestellt:

Die thrombozytäre Tyrosin-Phosphatase SHP-1 hemmt überschießende Collagen-induzierte Thrombozytenaggregation und arterielle Thrombose nach Gefäßverletzung in vivo. Pircher J, Koch E, Mannell H, Sohn HY, Pohl U, Krötz F. 77. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, Mannheim, 27. – 30.04.2011

The endothelial tyrosine phosphatase SHP-1 mediates antithrombotic effects in TNF α -induced inflammation in vivo. Koch E, Pircher J, Mannell H, Pohl U, Sohn H-Y and Krötz F. 77. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, Mannheim, 27. – 30.04.2011

Die Tyrosin-Phosphatase SHP-1 vermittelt antithrombozytäre Effekte bei endothelialer Entzündung in vivo. Koch E. 90st Annual Meeting of the German Physiological Society, Regensburg, 26. – 29.03.2011

Weitere Veröffentlichung als wissenschaftlicher Artikel:

ARNO regulates VEGF-dependent tissue responses by stabilizing endothelial VEGFR-2 surface expression, Mannell H, Pircher J, Chaudhry D, Alig S, Koch E, Mettler R, Pohl U, Krötz F. Cardiovasc Res 2012 Jan 1;93(1):111-9

7.6 Danksagung

Mein tiefer Dank gilt Prof. Florian Krötz, für die Aufnahme in sein Team und die hervorragende Betreuung, sowie für die fachliche und materielle Förderung meines Forschungsvorhabens. Seine hilfreichen Vorschläge und seine Zuversicht waren stets eine wertvolle Unterstützung.

Ich möchte Prof. Ulrich Pohl großen Dank aussprechen für die Möglichkeit, dieses Projekt an seinem Institut durchführen zu können.

Großer Dank an Dr. Joachim Pircher für die gute Zusammenarbeit im Labor und das kritische Lesen dieser Arbeit. Danke an Prof. Markus Wörnle für die Unterstützung bei der Publikation. Vielen Dank an Dr. Nicole Hellwig, für die kompetente und angenehme Einarbeitung in die chirurgischen Operationstechniken. Vielen Dank auch an PD Dr. Hanna Mannell. Ihre Kompetenz in inhaltlicher, methodischer und organisatorischer Hinsicht war von großer Bedeutung für diese Doktorarbeit.

Herzlicher Dank geht an Ramona Mettler, für die technische Unterstützung und die aufwändige Betreuung der Nabelschnurzellen, und natürlich für die nette Unterhaltung im Labor. Auch den anderen Mitarbeitern und Kollegen der Arbeitsgruppe und des Walter-Brendel-Zentrums möchte ich ganz herzlich für die überaus angenehme, offene und unkomplizierte Atmosphäre danken.

Ich möchte mich beim FöFoLe-Programm der LMU bedanken für viele spannende wissenschaftliche Vorträge und auch die finanzielle Unterstützung.

Meinen Freunden danke ich für die gemeinsame Freizeit, die neue Kraft fürs Labor geschenkt hat. Mein größter Dank gilt meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, deren Unterstützung ich mir stets sicher sein kann.

Eidesstattliche Versicherung

Pircher, Elisabeth

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Die endotheliale Tyrosinphosphatase SHP-1 spielt eine wichtige Rolle für die vaskuläre Hämostase in TNF α -induzierter Inflammation *in vivo*

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 01.03.2019

Elisabeth Pircher